

Aus dem Institut für Toxikologie und Pharmakologie der Universitätsmedizin Rostock

Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Burkhard Hinz

Untersuchungen zum Mechanismus der proapoptotischen Wirkung von Lovastatin-Lacton auf humane Lungenkarzinomzellen

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von

Kristin Dodt geb. Emmrich, geb. am 17. April 1990 in Berlin-Lichtenberg

aus Rostock

Rostock, 19. Februar 2018

Gutachter:

1. Gutachter:

Prof. Dr. rer. nat. Burkhard Hinz,
Institut für Pharmakologie und Toxikologie,
Universitätsmedizin Rostock

2. Gutachter:

Prof. Dr. med. Holger S. Willenberg,
Zentrum für Innere Medizin, Sektion Endokrinologie und Stoffwechsel,
Universitätsmedizin Rostock

3. Gutachter:

PD Dr. med. Dr. rer. nat. Harald Mückter,
Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie,
Ludwig-Maximilians-Universität München

Datum der Einreichung: 12. Mai 2017

Datum der Verteidigung: 20. Dezember 2017

Teile dieser Arbeit wurden 2016 unter dem Titel „Lovastatin lactone elicits human lung cancer cell apoptosis via a COX-2/PPAR γ -dependent pathway“ in Oncotarget publiziert:

Walther U*, Emmrich K*, Ramer R, Mittag N, Hinz B (2016) Lovastatin lactone elicits human lung cancer cell apoptosis via a COX-2/PPAR γ -dependent pathway. Oncotarget 7:10345–10362.

* geteilte Erstautorschaft

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung.....	1
1.1 Theoretische Grundlagen	1
1.1.1 Statine	1
1.1.2 Maligne Lungentumoren	7
1.1.3 Cyclooxygenase-2 (COX-2).....	9
1.1.4 Prostaglandine.....	13
1.1.5 Peroxisomen-Proliferator-aktivierter Rezeptor γ (PPAR γ)	14
1.1.6 Apoptose	15
1.2 Zielsetzung der Arbeit.....	16
2 Material und Methoden	17
2.1 Material.....	17
2.1.1 Zelllinien	17
2.1.2 Medien und Zusätze	17
2.1.3 Puffer und Lösungen	17
2.1.4 Chemikalien	20
2.1.5 Proteinmarker	21
2.1.6 Antikörper	22
2.1.7 Kommerzielle Testsysteme.....	23
2.1.8 Verbrauchsmaterialien	23
2.1.9 Geräte.....	23
2.1.10 Software	24
2.2 Methoden	24
2.2.1 Zellbiologische Methoden	24
2.2.2 Proteinbiochemische Methoden.....	27
2.2.3 Immunologische Methoden.....	31

2.2.4 Statistik	35
3 Ergebnisse.....	36
3.1 Einfluss von Lovastatin-Lacton und -Säure auf die Zellviabilität	36
3.2 Einfluss von Lovastatin-Lacton und -Säure auf die Apoptose	36
3.2.1 DNA-Fragmentierung.....	36
3.2.2 Caspase und PARP	38
3.2.3 Zellmorphologie	39
3.3 Einfluss von Lovastatin-Lacton auf die COX-2- und PPAR γ -Expression	39
3.3.1 Konzentrationsabhängige Wirkung von Lovastatin	40
3.3.2 Zeitabhängige Wirkung von Lovastatin	41
3.4 Wirkung von Lovastatin auf die Prostaglandinsynthese sowie diesbezüglicher Einfluss eines COX-2-Inhibitors.....	43
3.5 Wirkung von Lovastatin auf die PPAR γ -Aktivität sowie diesbezüglicher Einfluss eines COX-2- und eines PPAR γ -Inhibitors.....	45
3.5.1 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen	45
3.5.2 Untersuchungen mittels Kernisolation	48
4 Diskussion.....	49
5 Zusammenfassung und Ausblick.....	55
6 Literaturverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis	XX
Tabellenverzeichnis	XXII
Danksagung	XXIII
Thesen	XXIV

Abkürzungsverzeichnis

15d-PGJ ₂	15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J ₂
4PL	<i>four-parameter logistic curve</i>
Abb.	Abbildung
ANOVA	Varianzanalyse (<i>analysis of variance</i>)
Apaf-1	Apoptose-auslösender Faktor 1
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	destilliertes Wasser (<i>Aqua destillata</i>)
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure (<i>bicinchoninic acid</i>)
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CoA	Coenzym A
COX	Cyclooxygenase
CRE	<i>cAMP response element</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DP-Rezeptor	Prostaglandin D-Rezeptor
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor (<i>epidermal growth factor receptor</i>)
EIA	Enzymimmunoassay
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EP-Rezeptor	Prostaglandin E-Rezeptor
Fc	<i>crystallisable fragment</i>
FKS	fetales Kälberserum
FPP	Farnesylpyrophosphat
FP-Rezeptor	Prostaglandin F-Rezeptor
G1	<i>gap 1</i>
GGPP	Geranylgeranylpyrophosphat
G-Protein	Guanosintriphosphat-bindendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
GW9662	2-Chloro-5-nitro-N-phenylbenzamid
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A

IC ₅₀	halbmaximale Hemmkonzentration (<i>half maximum inhibitory concentration</i>)
IgG	Immunglobulin G
IP-Rezeptor	Prostacyclin-Rezeptor
LDL	Lipoprotein geringer Dichte (<i>low density lipoprotein</i>)
max	oberer Grenzwert der Viabilität
MG132	Benzyl <i>N</i> -[[(2 <i>S</i>)-4-methyl-1-[[[(2 <i>S</i>)-4-methyl-1-[[[(2 <i>S</i>)-4-methyl-1-oxopentan-2-yl]amino]-1-oxopentan-2-yl]amino]-1-oxopentan-2-yl]carbamate
min	unterer Grenzwert der Viabilität
MOX	Methoxyamin
mRNA	mitochondriale Ribonukleinsäure (<i>messenger ribonucleic acid</i>)
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
NF-κB	nukleärer Faktor kappa B
NS-398	<i>N</i> -[2-(Cyclohexyloxy)-4-nitrophenyl]methansulfonamid
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
NSCLC	nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom (<i>non-small cell lung cancer</i>)
p	Wahrscheinlichkeit
PARP	Poly-(Adenosindiphosphat-Ribose-)Polymerase
PBS	<i>phosphate-buffered salt solution</i> (Pufferlösung)
PG	Prostaglandin
PGD ₂	Prostaglandin D ₂
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PGF _{2α}	Prostaglandin F _{2α}
PGH ₂	Prostaglandin H ₂
PGI ₂	Prostacyclin
PGJ ₂	Prostaglandin J ₂
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIB	<i>phosphatase inhibitor buffer</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPAR	Peroxisomen-Proliferator-aktivierter Rezeptor
PPRE	<i>peroxisome proliferator response element</i>
PSI-1	Proteasom-Inhibitor-1
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
PTGS2	Prostaglandin-Endoperoxid-Synthase 2
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
SCLC	kleinzelliges Lungenkarzinom (<i>small cell lung cancer</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEM	Standardfehler (<i>standard error of the mean</i>)
Skp2	S-Phase-Kinase-assoziiertes Protein 2 (<i>S-phase kinase-associated protein 2</i>)

SRE	<i>sterol response element</i>
Tab.	Tabelle
TATA-Box	Basen-Sequenz Thymin-Adenin-Thymin-Adenin
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBS-T	<i>Tris-buffered saline</i> mit Tween® 20
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TP-Rezeptor	Thromboxan-Rezeptor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
TXA₂	Thromboxan A₂
UDP	Uridindiphosphat
v/v	Volumen pro Volumen
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
w/v	Masse pro Volumen
WST-1	4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-Benzol-Disulfonat

1 Einleitung

1.1 Theoretische Grundlagen

1.1.1 Statine

Statine gehören zu den zehn am häufigsten verordneten Arzneimitteln in Deutschland (Glaeske *et al.* 2015). Sie finden vor allem Anwendung bei der Behandlung von Hypercholesterinämie oder der gemischten Dyslipidämie, zur Primärprävention kardiovaskulärer Erkrankungen bei Risikopatienten und zur Sekundärprävention bei Patienten mit bereits manifesten arteriosklerotischen Gefäßerkrankungen.

1.1.1.1 Wirkmechanismus

Statine interferieren mit der 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase), welche intrazellulär HMG-CoA zu Mevalonat reduziert (siehe Abb. 1-1), und hemmen somit den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt bei der Cholesterinsynthese (Brown & Goldstein 1980). Aus dem intrazellulären Cholesterin-

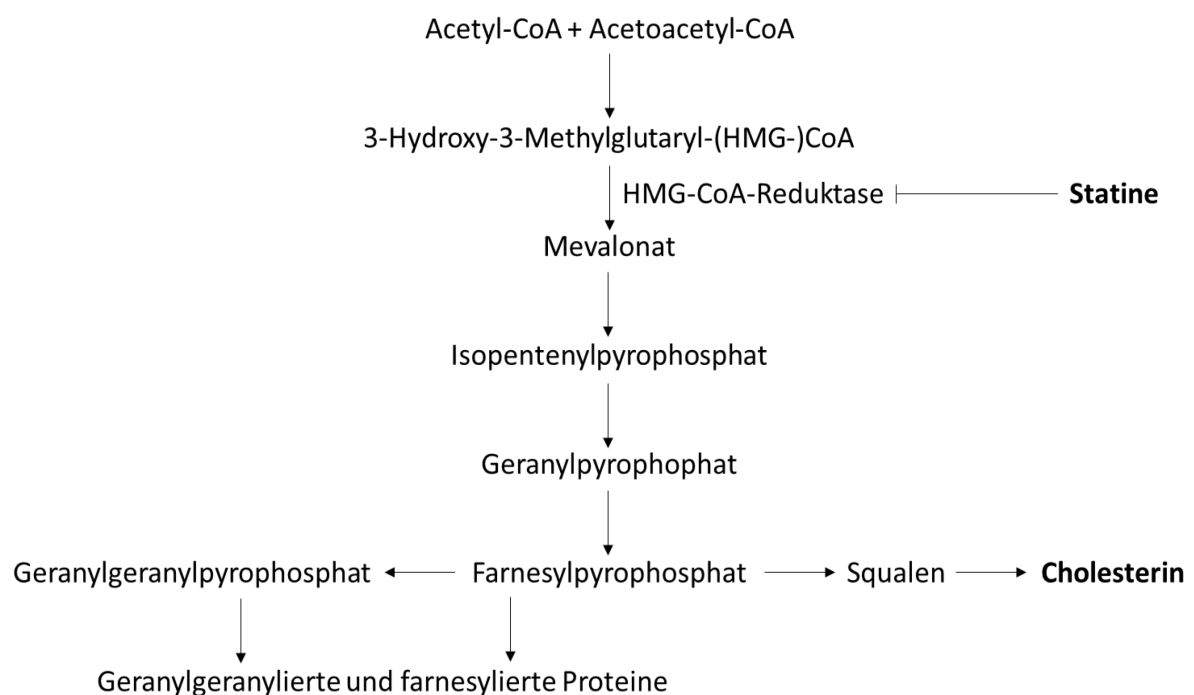


Abb. 1-1: Cholesterinsynthese-Weg und Wirkung von Statinen
(modifiziert nach Osmak 2012)

mangel folgt eine Hochregulation von LDL-Rezeptoren (*low density lipoprotein receptors*), wodurch wiederum mehr LDL aus dem Plasma in die Zellen aufgenommen wird (Goldstein & Brown 1987) und der Cholesteringehalt im Blut sinkt.

1.1.1.2 Nebenwirkungen und Kontraindikationen

Zu den häufiger beschriebenen Nebenwirkungen einer Statineinnahme gehören gastrointestinale Beschwerden wie zum Beispiel Übelkeit, Diarrhö oder Bauchschmerzen, ebenso ein asymptomatischer Anstieg der Transaminasen sowie Myopathien (Hamelin & Turgeon 1998). Die lebensgefährliche Rhabdomyolyse, die bis zu einem Nierenversagen führen kann, tritt hingegen selten auf (Bielecki *et al.* 1999).

Der Abbau der Statine erfolgt über den Cytochrom P450-Komplex. Bei gleichzeitiger Einnahme von Cytochrom P450-Hemmern treten durch den verringerten Abbau verstärkt Nebenwirkungen auf; in diesen Fällen sollte eine Dosisanpassung erfolgen. Zu solchen interagierenden Medikamenten gehören zum Beispiel Azol-Antimykotika, Makrolid-Antibiotika, HIV-Proteaseinhibitoren und Verapamil. Aber auch der Konsum von Grapefruitsaft kann zu einer Cytochrom P450-Hemmung führen (Gröchenig 2001).

Statine sind kontraindiziert bei Lebererkrankungen, Myopathien und Schwangerschaft bzw. Stillzeit. Ebenso sind sie kontraindiziert bei bekannter Überempfindlichkeit gegenüber diesen Medikamenten.

1.1.1.3 Statin-Lactone und -Säuren

Zurzeit sind in Deutschland die Statine Atorvastatin, Fluvastatin, Lovastatin, Pitavastatin, Pravastatin, Rosuvastatin und Simvastatin zugelassen (Stand: Mai 2017). Lovastatin, Simvastatin und Pravastatin haben ihren Ursprung in Stoffwechselprodukten der Pilze *Aspergillus terreus* und *Penicillium citrinum* (Alberts 1988), wohingegen die anderen Statine synthetisch hergestellt werden (Gröchenig 2001). Ihr gemeinsames Strukturmerkmal ist eine Seitenkette mit einem endständigen Ring, der entweder in offener (Säure) oder geschlossener Form (Lacton) vorliegt. Nur die „ringoffenen“ Statine hemmen aufgrund ihrer Ähnlichkeit mit dem Substrat HMG-CoA (siehe Abb. 1-2, rechts) die HMG-CoA-Reduktase. Statin-Lactone (Lovastatin und Simvastatin) sind zunächst inaktive Prodrugs und müssen in ihre aktive Form umgewandelt werden (Henwood & Heel 1988; Todd & Goa 1990; Hamelin & Turgeon 1998).

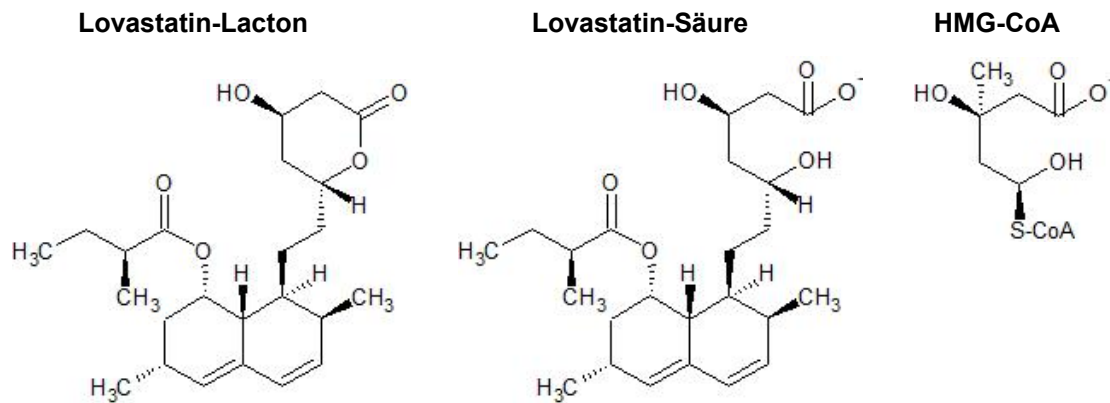


Abb. 1-2: Chemische Struktur von Lovastatin-Lacton (links), Lovastatin-Säure (mittig) und HMG-CoA (rechts)

In Abb. 1-2 sind die Strukturen von Lovastatin-Lacton und -Säure dargestellt.

Ein weiterer Unterschied zwischen den Statin-Säuren und -Lactonen besteht in ihren physikochemischen Eigenschaften. Die Prodrugs Lovastatin-Lacton und Simvastatin-Lacton sind bei einem pH-Wert von sieben um das etwa 300- bis 400-fache lipophiler als ihre Säureformen, welche wiederum etwa 100- bis 200-fach lipophiler als Pravastatin-Säure sind (Serajuddin *et al.* 1991). Je lipophiler ein Statin ist, desto besser kann es durch Membranen diffundieren (Serajuddin *et al.* 1991; Hamelin & Turgeon 1998).

In Studien konnte *in vivo* gezeigt werden, dass nach Applikation von Lovastatin-Lacton (Kantola *et al.* 1998c) und Simvastatin-Lacton (Kantola *et al.* 1998b), aber auch von Atorvastatin-Säure (Kantola *et al.* 1998a) jeweils auch die korrespondierende Säure- bzw. Lactonform im Plasma vorlagen. Demzufolge müssen in beide Richtungen Interkonversionsmechanismen existieren, die sich *in vitro* als pH-abhängige chemische Gleichgewichtsprozesse manifestieren (Kearney *et al.* 1993). *In vivo* werden Lactone durch enzymatische Hydrolyse via Paraoxonasen (Billecke *et al.* 2000; Draganov *et al.* 2000) in die korrespondierende „ringoffene“ Form umgewandelt. Umgekehrt konnte nachgewiesen werden, dass *in vitro* die „ringoffene“ Form in ATP- und CoA-abhängigen Prozessen (Prueksaritanont *et al.* 2001) oder durch UDP-Glucuronosyltransferasen (Prueksaritanont *et al.* 2002; Schirris *et al.* 2015) in das korrespondierende Lacton umgewandelt wird. Diese Prozesse zeigen, dass generell beide Statinformen bei der Evaluierung neuer Targets untersucht werden sollten.

1.1.1.4 Pleiotrope Effekte

Neben der bekannten cholesterinsenkenden Wirkung haben Statine pleiotrope Effekte, das heißt weitere pharmakologische Wirkungen auf andere Zielstrukturen. Im Falle der Statine sind diese Effekte als positiv zu bewerten. Wie die Arbeiten von Davignon sowie Liao und Laufs zusammenfassen, verbessern Statine unter anderem über eine gesteigerte Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid die Endotheldilatation und besitzen antioxidative Eigenschaften. Sie wirken unter anderem über eine Senkung des C-reaktiven Proteins entzündungshemmend und über eine Senkung der Matrix-Metalloproteinasen plaquestabilisierend (Davignon 2004; Liao & Laufs 2005). Auch eine Hemmung der Thrombusbildung ist hinsichtlich der gefäßprotektiven Wirkungen von Statinen interessant (Davignon 2004; Kavalipati *et al.* 2015).

1.1.1.5 Statine und Krebs

Seit einigen Jahren werden Statine hinsichtlich ihres Potenzials in der Krebstherapie untersucht und diskutiert. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* konnten antikanzerogene Effekte nachgewiesen werden. So zeigten Statine in unterschiedlichen Tumorzelllinien proapoptotische (Jones *et al.* 1994; Rubins *et al.* 1998; Dimitroulakos *et al.* 2001; Cafforio *et al.* 2005), antiproliferative (Sumi *et al.* 1992; Hawk *et al.* 1996), antiinvasive (Kusama *et al.* 2001; Kusama *et al.* 2002; Vainio *et al.* 2011) und antiangiogene Effekte (Depasquale & Wheatley 2006; Zhao *et al.* 2010; Lee *et al.* 2014).

Auch zahlreiche epidemiologische Studien geben Anhalt für eine negative Assoziation von Statinen mit Krebs.

Eine Studie von Nielsen *et al.* assoziiert die Einnahme von Statinen mit einer verminderten Tumormortalität von bis zu 15 % (Nielsen *et al.* 2012). Vor Kurzem zeigte auch eine prospektive Kohortenstudie bei Frauen in der Postmenopause mit Krebs, dass eine Statineinnahme mit einer geringeren Tumormortalität assoziiert ist (Wang *et al.* 2016).

Eine Metaanalyse von randomisierten kontrollierten Studien, Fall-Kontroll-Studien und Kohortenstudien konnte eine leichte Risikoreduktion von Darmkrebs nach Statineinnahme nachweisen, welche jedoch im Falle der randomisierten kontrollierten Studien statistisch nicht signifikant war (Lytras *et al.* 2014). Auch Liu *et al.* fanden in ihrer

Metaanalyse eine moderate Risikoreduktion, die in den Untergruppen „Enddarmkrebs“ und „lipophile Statine“ besonders ausgeprägt war (Liu *et al.* 2014).

Statine scheinen auch das Risiko von Speiseröhrenkrebs (28%ige Risikoreduktion), insbesondere von ösophagealen Adenokarzinomen bei Patienten mit Barrett-Ösophagus, zu mindern, wie in einer Metaanalyse von Singh *et al.* (2013) herausgefunden werden konnte.

Eine Metaanalyse, die den Zusammenhang zwischen Statinen und dem Risiko für ein hepatozelluläres Karzinom untersuchte, ergab einen inversen Effekt (Pradelli *et al.* 2013).

Auch das Risiko von Prostatakrebs scheint durch eine Statineinnahme signifikant gesenkt zu werden (Shannon *et al.* 2005; Yu *et al.* 2014). Das Mortalitätsrisiko von Prostatakrebs wurde durch eine Statineinnahme nach Diagnosestellung um 24 % reduziert. Der Effekt verstärkte sich, wenn Statine bereits vor der Krebsdiagnose eingenommen wurden (Yu *et al.* 2014).

Hinsichtlich Brustkrebs konnten zwei Metaanalysen keinen protektiven Effekt von Statinen zeigen (Baigent *et al.* 2005; Bonovas *et al.* 2005), allerdings scheint eine vorherige Statineinnahme mit einem niedrigeren Krebsstadium bei Diagnosestellung einherzugehen (Desai *et al.* 2015).

Bezüglich Lungenkrebs konnten Khurana *et al.* (2007) in einer retrospektiven Fall-Kontroll-Studie an Veteranen eine 55%ige Risikoreduktion nach mindestens fünfmonatiger Statineinnahme nachweisen. Metaanalysen hingegen fanden weder eine positive noch eine negative Korrelation zwischen Statinen und Lungenkrebs (Tan *et al.* 2013; Deng *et al.* 2013). In Phase 2-Studien ermittelten Han *et al.* (2011a) jedoch bei Ko-Applikation von Simvastatin eine bessere Wirksamkeit von Gefitinib bei einer relativ Gefitinib-resistenten Untergruppe des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms (NSCLC, *non-small cell lung cancer*), den „wild-type EGFR nonadenocarcinomas“. Auch die Wirksamkeit von Irinotecan in Kombination mit Cisplatin wurde durch Simvastatin bei starken Rauchern mit kleinzelligem Lungenkarzinom (SCLC, *small cell lung cancer*) im Stadium „*Extensive Disease*“ verbessert (Han *et al.* 2011b).

In Hinsicht auf Bauchspeicheldrüsenkrebs ergab eine Metaanalyse von 2008 keinen signifikanten Einfluss von Statinen (Bonovas *et al.* 2008; Simon *et al.* 2016). In einer Fall-Kontroll-Studie von Carey *et al.* (2013) wurde bei männlichen Rauchern jedoch ein signifikant protektiver Effekt von Statinen gefunden.

Als ein möglicher Mechanismus dieser Statinwirkungen, die über die alleinige Cholesterinsenkung hinausgehen, wird die Hemmung der HMG-CoA-Reduktase und die nachfolgend verminderte Bildung von Mevalonat postuliert. Aus Mevalonat werden die wichtigen Isoprenoide Farnesylpyrophosphat (FPP) und Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) gebildet (siehe Abb. 1-1). Diese spielen in zahlreichen physiologischen Prozessen wie der Zellkommunikation und der Proteinsynthese, bei Zellwachstum und -differenzierung eine Rolle (Kubatka *et al.* 2014): Isoprenoide binden an Proteine wie zum Beispiel die kleinen GTP-bindenden Proteine (G-Proteine) Ras und Rho, wodurch deren Translokation vom Zytosol zur Membran gesteuert wird. Dadurch werden unterschiedliche Protein-Protein- und Protein-Membran-Interaktionen möglich (Osmak 2012). Unter anderem wird so die Signaltransduktion von Membran-Rezeptoren reguliert, welche bei der Apoptose, der Proliferation und der Differenzierung von Zellen von Bedeutung sind. Eine Statin-vermittelte verminderte Isoprenylierung könnte somit zu einer proapoptotischen und antiproliferativen Wirkung führen (Kubatka *et al.* 2014). Diese These wird durch Beobachtungen gestützt, bei welchen eine Hinzugabe von Isoprenoid-Intermediaten die antiinvasive (Kusama *et al.* 2001; Kusama *et al.* 2002) und proapoptotische (Cafforio *et al.* 2005) Wirkung von Statinen teilweise aufhebt.

Eine weitere Erklärung für die antikanzerogenen Wirkungen der Statine beschreibt einen von der HMG-CoA-Reduktase unabhängigen Mechanismus. Rao *et al.* (1999) untersuchten Lovastatin-Lacton an Brustkrebszellen und fanden eine durch die ringgeschlossene Form hervorgerufene Hemmung des Proteasoms, einem Proteinkomplex, der zu den Proteasen zählt. Die Hemmung führt zu einer Akkumulation der Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren p21 und p27, welche im Zellzyklusarrest in der G1-Phase und in der Apoptose resultieren. In einer weiteren Studie zeigte auch Mevastatin durch intrazelluläre Kumulation der Lacton-Form eine proteasomale Hemmung mit Apoptose in Neuroblastom-Zellen (Kumar *et al.* 2002). Pravastatin als ringoffene Form hingegen zeigte keinen solchen Effekt. Auch Wójcik *et al.* (2000) stellten in einer Studie an Kolonkarzinomzellen von Mäusen fest, dass Lovastatin-Lacton eine

Modulation des Proteasoms hervorruft und im Vergleich zur Säure-Form stärker zytotoxisch wirkt.

Erst kürzlich konnte in einer Studie ein Zusammenhang zwischen der Hemmung der HMG-CoA-Reduktase und dem Zellzyklusarrest durch p21 und p27 hergestellt werden. Eine Lovastatin-vermittelte Senkung von Geranylgeranyl-Isoprenoiden führte zu einer Degradation des Enzyms Skp2 (*S-phase kinase-associated protein 2*), welches p21 und p27 für den proteasomalen Abbau markiert (Vosper *et al.* 2015). Die durch Lovastatin hervorgerufene verminderte Markierung führt somit zum verminderten proteasomalen Abbau von p21 und p27 und zum Zellzyklusarrest.

Weitere mögliche Statin-induzierte proapoptotische Mechanismen beinhalten mitunter die Aktivierung von Caspasen (Marcelli *et al.* 1998; Cafforio *et al.* 2005; Shellman *et al.* 2005) sowie die Hochregulation des proapoptotischen Proteins Bax bei gleichzeitiger Downregulation des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 (Kubatka *et al.* 2012; Yu *et al.* 2013).

1.1.2 Maligne Lungentumoren

1.1.2.1 Statistische Aspekte

Lungenkrebs gehört nach Angaben des Zentrums für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut mit einer Inzidenz von etwa 65 pro 100 000 Einwohner im Jahr 2012 in Deutschland zu den häufigen Krebserkrankungen. Hinsichtlich der Inzidenz stand Lungenkrebs im Jahr 2012 im Vergleich mit anderen Krebsarten bei Männern nach Prostatakrebs an zweiter Stelle. Bei Frauen war Lungenkrebs nach Brustkrebs und Darmkrebs die dritthäufigste neuauftretende Krebserkrankung.

In Bezug auf die Mortalität belegte Lungenkrebs 2012 bei Männern sogar den ersten Rang, gefolgt von Darmkrebs und Prostatakrebs. Bei Frauen war Lungenkrebs nach Brustkrebs die zweithäufigste tumorassoziierte Todesursache.

2012 starben rund 29 700 Männer und 14 800 Frauen an den Folgen von Lungenkrebs. Die relative 5-Jahresüberlebensrate bei neudiagnostizierten Lungenkarzinomen beträgt für Frauen 21 % und für Männer 16 % (www.krebsdaten.de).

1.1.2.2 Einteilung

Unter Lungenkrebs wird im Allgemeinen das Bronchialkarzinom verstanden. Es kann unterteilt werden in das seltenere kleinzellige Lungenkarzinom (SCLC, *small cell lung cancer*), das 15 % der Bronchialkarzinome ausmacht, und das häufigere nicht-kleinzellige Lungenkarzinom (NSCLC, *non-small cell lung cancer*), welches in 85 % der Fälle auftritt. Das NSCLC vereint die histologischen Typen Plattenepithelkarzinom, Adenokarzinom und großzelliges Lungenkarzinom.

Bei Lungentumoren kann es sich allerdings auch um Lungenmetastasen handeln, die meist von kolorektalen Karzinomen oder Mammakarzinomen ausgehen. Selten treten Karzinoide auf, die zu den neuroendokrinen Tumoren gehören. Möglich sind zudem benigne Lungentumoren wie zum Beispiel Chondrome, Lipome oder Fibrome.

1.1.2.3 Therapie

Die Therapie des Lungenkarzinoms ist komplex und richtet sich nach dem histologischen Typ sowie dem Stadium der Erkrankung. Sie ist auf den jeweiligen Patienten individuell abzustimmen. Dabei sollten Alter, Komorbiditäten und Wünsche des Patienten berücksichtigt werden. Die bisher gültige S3-Leitlinie von 2010 ist abgelaufen und wird zurzeit überprüft (www.awmf.org, Stand 05/2017). Grundsätzlich jedoch baut die Therapie auf den drei Säulen operative Verfahren, Strahlentherapie und Systemtherapie (Chemo- oder Immuntherapie) auf. Nachfolgend soll ein kleiner Überblick über die speziell für das Lungenkarzinom relevanten Therapiemodalitäten, die zuletzt gültig waren, gegeben werden.

Das NSCLC wird primär operativ behandelt. Ziel ist eine komplette Resektion mit Lymphknotendissektion. Adjuvant ist meist eine Chemotherapie erforderlich, gegebenenfalls auch eine Radiatio. Bei nicht-operationsfähigen Patienten oder hohem Tumorstadium entfällt die Operation und es erfolgen allein oder kombiniert die Radiotherapie oder Chemotherapie. Die Chemotherapie wird meist als Kombination aus Cisplatin und anderen Zytostatika durchgeführt. Bei Nicht-Plattenepithelkarzinomen kann zusätzlich der VEGF-Antikörper Bevacizumab angewendet werden. In fortgeschrittenen Stadien kann ergänzend zur platinbasierten Kombinationschemotherapie der gegen den EGF-Rezeptor (*epidermal growth factor receptor*) gerichtete Antikörper Cetuximab

eingesetzt werden. Bei Patienten mit aktivierender EGF-Rezeptor-Mutation kann der Tyrosinkinasehemmer Gefitinib empfohlen werden.

Das SCLC wird hingegen eher systemisch behandelt. Im Stadium „Limited Disease“ ist auch eine primär operative Therapie mit adjuvanter Chemotherapie möglich. Chemotherapie der ersten Wahl ist die Kombination aus Cisplatin und Etoposid. Im Stadium „Extensive Disease“ erfolgt primär die Polychemotherapie mit standardmäßig einem platinhaltigen Zytostatikum und Etoposid. Alternativ kommen anthrazyklinhaltige Kombinationen, Topoisomerase-I-Inhibitoren, Paclitaxel oder Gemcitabin zum Einsatz, nicht jedoch als Monotherapie. Eine prophylaktische Radiatio des Schädels verbessert jeweils die Prognose (www.awmf.org).

Nicht zuletzt sind eine symptomorientierte Therapie und bei Notwendigkeit die palliative Therapie von Bedeutung.

Trotz der vielfältigen Therapiemöglichkeiten scheint angesichts der immer noch hohen Mortalität von Lungenkrebs eine weitere Forschung auf diesem Gebiet notwendig. Da fast zwei Drittel der Fälle bei Diagnosestellung inoperabel sind, sollte besonderer Wert auf die Verbesserung der Systemtherapie gelegt werden.

1.1.3 Cyclooxygenase-2 (COX-2)

Cyclooxygenasen sind Enzyme, die bei der Prostanoidsynthese von Bedeutung sind. Wie in einem Review von Hinz und Brune aus dem Jahr 2002 beschrieben, katalysieren sie die ersten beiden Schritte bei der Synthese von Prostaglandinen, Prostacyclin und Thromboxanen aus Arachidonsäure (siehe Abb. 1-3) und werden deshalb auch als Prostaglandin-G/H-Synthasen oder Prostaglandin-Endoperoxid-Synthasen bezeichnet. Dabei nehmen sie eine bifunktionelle Rolle ein, denn sie haben zum einen eine Cyclooxygenase-Funktion, welche aus Arachidonsäure Prostaglandin G₂ synthetisiert, und zum anderen eine Peroxidase-Funktion, wodurch Prostaglandin G₂ zu Prostaglandin H₂ umgewandelt wird (Hinz & Brune 2002). Es werden die beiden Isoformen Cyclooxygenase-1 (COX-1) und Cyclooxygenase-2 (COX-2) voneinander unterschieden. Auch über eine Cyclooxygenase-3 (COX-3) wird berichtet. Ihre mRNA ist eine Splicing-Variante der COX-1-mRNA mit noch erhaltenem Intron 1. Die Existenz eines entsprechenden humanen, biologisch funktionellen Enzyms COX-3 ist jedoch fraglich (Schwab *et al.* 2003).

Die COX-1 wird vor allem konstitutiv, das heißt permanent und unabhängig von der Stoffwechsellage, exprimiert und kommt in vielen Geweben vor. So tritt sie in Blutgefäßen, Zellen des Interstitiums, glatten Muskelzellen, Thrombozyten und Mesothelzellen auf (Zidar *et al.* 2009). Sie spielt bei physiologischen Prozessen wie zum Beispiel dem Schutz der Magenschleimhaut und der Blutgerinnung eine Rolle. Die COX-2 hingegen wird vor allem bei Entzündungen durch Zytokine und andere Entzündungsmediatoren induziert und findet sich in Entzündungszellen. Dort synthetisiert die COX-2 Prostanoid, die bei pathologischen Prozessen wie der akuten und chronischen Entzündungsreaktion involviert sind (Hinz & Brune 2002). Die COX-2 tritt jedoch auch konstitutiv auf und findet sich vor allem in den Parenchymzellen vieler Gewebe (Zidar *et al.* 2009). Auch in Tumoren tritt die COX-2 auf (siehe Abschnitt 1.1.3.3).

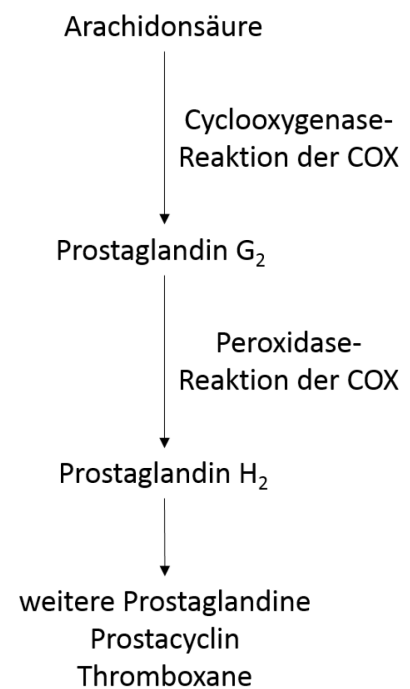


Abb. 1-3: Bifunktionelle Rolle der Cyclooxygenase (COX) bei der Biosynthese von Prostaglandinen, Prostacyclin und Thromboxanen
(modifiziert nach Hinz & Brune 2002)

1.1.3.1 Regulation der COX-2

Das humane Gen PTGS2, welches die COX-2 kodiert, liegt auf dem Chromosom 1 (1q25.2-q25.3). Das translatierte Protein ist 604 Aminosäuren lang und hat ein Molekulargewicht von ca. 69 kDa (www.genecards.org). Die Regulation der COX-2 erfolgt auf verschiedenen Ebenen und wurde in einem Review von Rumzhum und Ammit wie folgt zusammengefasst:

Zum Ersten befinden sich am 5'-Ende des Gens verschiedene regulatorische Sequenzen, wie zum Beispiel das *peroxisome proliferator response element* (PPRE), zwei *cAMP response elements* (CRE), ein *sterol response element* (SRE) und zwei Bindungsstellen für den *nuclear factor kappa B* (NF-κB) sowie eine TATA-Box. An diese Stellen binden die entsprechenden Transkriptionsfaktoren, welche die Transkription der COX-2 steuern können.

Zum Zweiten kann posttranskriptionell die COX-2-mRNA durch am 3'-Ende bindende Proteine oder durch microRNA reguliert werden.

Zum Dritten erfolgt posttranslational die Modifikation des COX-2-Proteins durch N-Glykosylierung, Ausbildung von Disulfidbrücken, Membraninsertion und die Bildung von Dimeren. Dadurch wird die zelluläre Lokalisation der COX-2, hauptsächlich im endoplasmatischen Retikulum und der Zellkernhülle, bestimmt. Auch der Abbau des Enzyms, der entweder Arachidonsäure-abhängig oder proteasomal verläuft, kann so gesteuert werden (Rumzhum & Ammit 2016).

1.1.3.2 Inhibition der COX-2

Die wohl bekanntesten Inhibitoren der Cyclooxygenasen sind die Nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR) wie zum Beispiel Acetylsalicylsäure oder Ibuprofen. Sie hemmen sowohl die COX-1 als auch die COX-2 und werden als traditionelle COX-Hemmer bezeichnet. Die Inhibition der COX führt zu einer verminderten Bildung von Prostaglandinen, welche zum Beispiel bei der Regulation von Entzündungen, der Schmerzempfindung und der Thrombozytenaggregation von Bedeutung sind. Unter anderem damit wird die antiinflammatorische und analgetische Wirkung der NSAR begründet (Díaz-González & Sánchez-Madrid 2015).

Die Verabreichung der NSAR ist aufgrund ihrer Nebenwirkungen limitiert, die sich vor allem als gastrointestinale Beschwerden bis hin zu gastrointestinalen Ulcera äußern. Nach einem Review von Mendes *et al.* (2012) sind sie auf die COX-1-Hemmung und eine daraus resultierende Abnahme von für die Magenschleimhaut protektiven Prostaglandinen zurückzuführen. Der Gedanke, gezielt die COX-2 zu hemmen und somit diese Nebenwirkungen zu umgehen, führte 1999 zur Entwicklung der ersten selektiven COX-2-Hemmer (Coxibe) Celecoxib und Rofecoxib. Im Vergleich zu den traditionellen NSAR zeigen Coxibe ein um 50 bis 60 % reduziertes Risiko schwerer Komplikationen im oberen Gastrointestinaltrakt (Pronai *et al.* 2003). Jedoch zeigte sich bei Coxiben ebenso wie bei Diclofenac ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko (Bhala *et al.* 2013).

Ein weiterer selektiver COX-2-Hemmer ist NS-398 bzw. N-[2-(Cyclohexyloxy)-4-nitrophenyl]methansulfonamid (Futaki *et al.* 1994). NS-398 eignet sich für Untersuchungen an der COX-2, wie sie im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden.

1.1.3.3 COX-2 und Krebs

Wie ein Review von Rizzo aus dem Jahr 2011 zusammenfasst, wurde in epidemiologischen Studien beobachtet, dass unter Langzeiteinnahme von Acetylsalicylsäure und anderen NSAR die Inzidenz von Kolon-, Prostata- und Mammakarzinomen sowie Hodgkinlymphomen gesenkt wurde. Es sank zudem die Mortalität von sporadischen Kolonkarzinomen und es verzögerte sich der Progress von Adenomen zu Adenokarzinomen bei Patienten mit familiärer adenomatöser Polyposis coli (Rizzo 2011). Bei Untersuchungen zu einem Zusammenhang zwischen der COX-2 und Tumoren fand sich eine COX-2-Überexpression in soliden Tumoren wie zum Beispiel in kolorektalen Karzinomen und Adenomen (Eberhart *et al.* 1994), in Ösophaguskarzinomen (Zimmermann *et al.* 1999), in Pankreaskarzinomen (Tucker *et al.* 1999) und in Lungenkarzinomen, insbesondere Adenokarzinomen (Hida *et al.* 1998). Aber auch in unterschiedlichen malignen hämatologischen Neoplasien wurde eine erhöhte COX-2-Expression beobachtet (Bernard *et al.* 2008). In klinischen Studien war zudem die Anwesenheit der COX-2 in Tumoren mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Rizzo 2011).

In Studien wurde ebenfalls untersucht, ob sich die antikanzerogenen Effekte von COX-Inhibitoren wie den NSAR und von Statinen synergistisch verhalten, was zur Minimierung der jeweiligen Dosierung und somit auch der entsprechenden Nebenwirkungen beitragen könnte. Ein Review von Xiao und Yang stellte heraus, dass sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine Kombination von NSAR mit Statinen die jeweils einzelnen antikanzerogenen Eigenschaften verstärkte. Die antikanzerogene Wirkung der NSAR sei jedoch vor allem unabhängig von der Cyclooxygenase. Auch epidemiologisch war eine kombinierte Gabe von COX-Inhibitoren und Statinen der einzelnen Verabreichung hinsichtlich Schutz vor der Entwicklung von kolorektalen Karzinomen und Prostatakarzinomen überlegen (Xiao & Yang 2008).

Im Gegensatz zu den postulierten prokanzerogenen Eigenschaften der COX-2 stehen Studien, bei denen eine gentechnisch hervorgerufene COX-2-Überexpression zum einen in Osteosarkomzellen die Apoptoserate erhöhte und die Zellproliferation senkte (Xu *et al.* 2006) und zum anderen Mäuse vor der Entwicklung von experimentell induzierten Hauttumoren schützte (Bol *et al.* 2002). Auf der anderen Seite konnte *in vitro* durch unsere und andere Arbeitsgruppen eine Involvierung des COX-2-Enzyms in die durch

verschiedene Chemotherapeutika oder Cannabinoide hervorgerufene Apoptose festgestellt werden (Eichele *et al.* 2008; Eichele *et al.* 2009; Elrod *et al.* 2009; Kuc *et al.* 2012; Soliman *et al.* 2016). Hierbei wurde eine Induktion der Synthese proapoptotisch wirkender Prostaglandine der D- und J-Reihe ermittelt.

1.1.4 Prostaglandine

Prostaglandine gehören zu den Eicosanoiden und wurden erstmals 1935 beschrieben (Euler 1935). Da vermutet wurde, dass sie aus der Prostata, englisch „*prostate gland*“, stammen, wurden sie „Prostaglandine“ genannt.

Prostaglandine (PG) sind in viele physiologische Prozesse involviert. Sie vermitteln und regulieren immunologische Prozesse, Schmerz, Wundheilung, Knochenstoffwechsel, Wasserhaushalt, Blutdruck, Blutgerinnung, Zellteilung und Ovulation. Aber auch bei pathophysiologischen Prozessen wie Entzündungen und der Kanzerogenese sind sie von Bedeutung (Na & Surh 2003). So fanden sich in vielen Tumoren erhöhte Prostaglandinspiegel und Prostaglandin E₂ (PGE₂) gilt als fördernder Faktor von Tumorbildung, Tumorprogression und Metastasierung (Wang & DuBois 2016). Prostaglandine der J-Serie hingegen, insbesondere 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J₂ (15d-PGJ₂), vermitteln in verschiedenen Zellen proapoptotische und antiproliferative Eigenschaften (Na & Surh 2003).

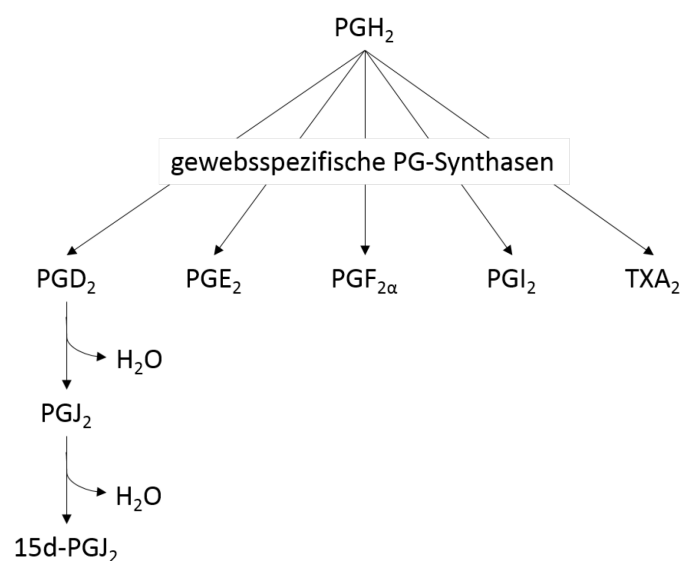


Abb. 1-4: Biosynthese der Prostaglandine

Aus Prostaglandin H₂ werden durch gewebsspezifische Prostaglandin-(PG-)Synthasen die Prostaglandine PGD₂, PGE₂, PGF_{2α}, PGI₂ und TXA₂ hergestellt. Aus PGD₂ entsteht durch Wasserabspaltung PGJ₂ bzw. 15d-PGJ₂.

Bei der Prostaglandinsynthese wird in der Zelle zunächst aus Arachidonsäure durch die Cyclooxygenasen COX-1 und COX-2 Prostaglandin H_2 (PGH₂) synthetisiert. Nach einem Review von Scher und Pillinger wird PGH₂ durch verschiedene spezifische PG-Synthasen in die Prostaglandine PGD₂, PGE₂, PGF_{2α}, PGI₂ (Prostacyclin) und TXA₂ (Thromboxan A₂) umgewandelt. PGJ₂ und 15d-PGJ₂ entstehen durch Wasserabspaltung aus PGD₂ (siehe Abb. 1-4). Je nach Gewebe werden unterschiedliche Prostaglandine bevorzugt synthetisiert. Die Prostaglandine werden dann in den Extrazellularraum abgegeben. Da sie instabil sind, wirken sie vor allem in unmittelbarer Nähe des Syntheseortes, zum einen auf die eigene Zelle als autokrine Hormone und zum anderen auf Nachbarzellen als parakrine Hormone. Ihre Wirkung erlangen sie durch Bindung an G-Protein-gekoppelte Membranrezeptoren, welche je nach präferenziell gebundenem Prostaglandin als DP-, EP-, FP-, IP- und TP-Rezeptor (Thromboxan-Rezeptor) bezeichnet werden. 15d-PGJ₂ kann an den intranukleären Rezeptor PPAR γ (Peroxisomen-Proliferator-aktivierter Rezeptor γ) binden (Scher & Pillinger 2005).

1.1.5 Peroxisomen-Proliferator-aktivierter Rezeptor γ (PPAR γ)

Peroxisomen-Proliferator-aktivierte Rezeptoren (PPARs) sind nukleäre Rezeptoren, die in ihrer inaktiven Form im Zytosol vorliegen. Wie ein Review von Scher und Pillinger zusammenfasst, sind sie nach ihrer Aktivierung durch einen Liganden und Translokation in den Zellkern als Transkriptionsfaktoren bei der Genregulation von Bedeutung. Im Zellkern bilden sie mit einem ebenfalls aktivierten Retinoid-X-Rezeptor (RXR) ein Heterodimer, binden als Komplex an das *PPAR-response element* (PPRE) und stimulieren so die Transkription. PPREs sind DNA-Sequenzen in der Promotorregion des Zielgens, die von DNA-bindenden Domänen der PPARs erkannt werden (Scher & Pillinger 2005).

Es werden die drei PPARs PPAR α , PPAR β/δ und PPAR γ unterschieden. Alle drei kommen in unterschiedlichen Geweben vor und sind bei der Regulation unterschiedlicher Gene involviert (siehe Tab. 1-1).

Die Aktivierung von PPAR γ führte in verschiedenen Tumoren zu einem Wachstumsstillstand (Mueller *et al.* 2000). Auch ein Zusammenhang zwischen einer PPAR γ -Aktivierung durch das Prostaglandin 15d-PGJ₂ und der Apoptose konnte hergestellt werden (Na & Surh 2003). Die Bindung des aktivierten PPAR γ -RXR-

Komplexes an den Promotor des Tumorsuppressorgens PTEN (*phosphatase and tensin homolog*), eine folgende Hochregulation von PTEN und dadurch vermehrte Hemmung des antiapoptotischen Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)/Akt-Signalweges könnte eine Erklärung dafür sein (Na & Surh 2003).

In den letzten Jahren hat sich unter anderem durch Arbeiten unserer Arbeitsgruppe die Synthese COX-2-abhängiger Prostaglandine wie PGD₂ oder 15d-PGJ₂ mit nachfolgender PPAR γ -Aktivierung als ein proapoptotischer Mechanismus herausgestellt (Clay *et al.* 1999; Eichele *et al.* 2008; Eichele *et al.* 2009; Ramer *et al.* 2013a; Ramer *et al.* 2013b).

PPAR γ kann durch den PPAR γ -Antagonisten GW9662 bzw. 2-Chloro-5-nitro-N-phenylbenzamid gehemmt werden. Dabei wird die Bindung von Liganden irreversibel blockiert (Leesnitzer *et al.* 2002).

Tab. 1-1: Vorkommen und Funktion der PPAR-Isoformen (modifiziert nach Kieć-Wilk *et al.* 2005)

PPAR	Vorkommen	Funktion
PPAR α	Herz, Leber, Skelettmuskel	Fettsäureoxidation, antiinflammatorische Wirkung
PPAR β/δ	verschiedene Gewebe	Organogenese, Fettstoffwechsel
PPAR γ	Adipozyten, Hepatozyten, Makrophagen	Adipogenese, Fettstoffwechsel, Insulinsensitivität, Glukosestoffwechsel, Atherosklerose, antiproliferative und antiangiogene Wirkung

1.1.6 Apoptose

Die Apoptose, der kontrollierte Zelltod, spielt für die Homöostase im Körper ebenso eine Rolle wie Zellteilung und Migration. Die Apoptose ist komplex und kann über verschiedene Wege ausgelöst werden. Gemeinsam ist den Mechanismen die schlussendliche Aktivierung von Caspasen.

In einem Review aus dem Jahr 2000 fasst Hengartner die Abläufe zusammen: Der extrinsische Weg wird über sogenannte „Todesrezeptoren“, wie zum Beispiel CD95 (*cluster of differentiation 95*), vermittelt. Die Bindung von Liganden, wie beispielsweise

CD95-Liganden, führt über eine Clusterbildung des Rezeptors zur Bildung eines die Caspase-8 aktivierenden Komplexes. Die Caspase-8 wiederum aktiviert durch proteolytische Spaltung die Caspase-3, welcher eine Schlüsselrolle bei der Apoptose zugeschrieben wird. Der intrinsische Weg wird auch als mitochondrialer Signalweg bezeichnet. Auslöser können beispielsweise DNA-Schäden sein. Proapoptotische Vertreter der Bcl-(*B-cell lymphoma*)-2-Familie wie Bax oder Bad setzen aus dem Mitochondrium Cytochrom c frei, welches mit Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor 1*) und der Procaspase-9 das Apoptosom bildet. Das Apoptosom aktiviert die Caspase-3 (Hengartner 2000).

Die Apoptose geht mit verschiedenen sichtbaren Zellveränderungen einher: Die Zelle schrumpft und die DNA kondensiert. An der Membran bilden sich knospenartige Ausbuchtungen aus, das sogenannte „*membrane blebbing*“ (Köhler *et al.* 1990; Hengartner 2000). Schließlich bleiben von der Zelle nur noch Fragmente übrig, die „Apoptosekörper“, welche phagozytiert werden.

1.2 Zielsetzung der Arbeit

Statine werden zurzeit hinsichtlich einer potenziell antikanzerogenen Wirkung untersucht. Der Mechanismus, der der *in vitro* festgestellten proapoptotischen Wirkung zugrunde liegt, ist jedoch noch nicht geklärt. Als ein proapoptotischer Wirkmechanismus verschiedener antikanzerogener Verbindungen konnte unter anderem auch bei Lungenkarzinomzellen durch unserer Arbeitsgruppe die PPAR γ -Aktivierung durch COX-2-abhängig synthetisierte Prostaglandine gezeigt werden (Eichele *et al.* 2009; Ramer *et al.* 2013a; Ramer *et al.* 2013b). Bei verschiedenen Zelllinien konnte eine durch Statine hervorgerufene COX-2-Induktion (Degraeve *et al.* 2001; Chen *et al.* 2004) und eine PPAR γ -Aktivierung (Yano *et al.* 2007) beobachtet werden. Eine Verknüpfung dieser Targets hinsichtlich der proapoptotischen Wirkung von Statinen auf Lungenkarzinomzellen wurde jedoch noch nicht analysiert. Die vorliegende Arbeit untersucht einen möglichen Zusammenhang zwischen einer durch Lovastatin induzierten COX-2-Expression, COX-2-abhängig synthetisierten Prostaglandinen, Prostaglandin-vermittelter PPAR γ -Aktivierung und hieraus resultierender Apoptose. Somit soll aufgezeigt werden, ob Lovastatin ein potenzielles Tumorthapeutikum darstellt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien

A549: humane Lungenkarzinomzellen (NSCLC), Nr.: ACC 107
DSMZ GmbH, Braunschweig

H358: humane Lungenkarzinomzellen (NSCLC), Nr.: CRL-5807
ATCC-LGC, Wesel

2.1.2 Medien und Zusätze

DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*)

- mit 4,5 g/l Glukose und 4 mM L-Glutamin Lonza, Köln

FKS (Fetales Kälberserum) PAN Biotech, Aidenbach

Penicillin/Streptomycin Invitrogen, Darmstadt

2.1.3 Puffer und Lösungen

Blockierungslösung (Milchpulver 5 % (w/v)):	Milchpulver	10 g
	TBS-T	ad 200 ml

Blotpuffer (1x):	Tris Ultrapure	3,03 g
	Glycin	14,41 g
	SDS	0,5 g
	Methanol	200 ml
	Aqua dest.	ad 1 000 ml

ECL-Lösung I:	Luminol (250 mM)	250 µl
	p-Cumarinsäure (90 mM)	110 µl
	Tris HCl pH 8,5 (1 M)	2,5 ml
	Aqua dest.	ad 25 ml

ECL-Lösung II:	H ₂ O ₂ (30 %)	150 µl
	Tris HCl pH 8,5 (1 M)	2,5 ml
	Aqua dest.	<i>ad</i> 25 ml
Glycin-Stripp-Puffer (1x):	Glycin	15,0 g
	NaCl	29,2 g
	HCl	bis pH 2,5
	Aqua dest.	<i>ad</i> 1 000 ml
Hypotonischer Puffer (pH 7,5):	HEPES	0,48 g
	NaF	24 mg
	Na ₂ MoO ₄ (0,1 M)	10 µl
	EDTA (0,1 M)	100 µl
	Aqua dest.	<i>ad</i> 100 ml
Lämmli-Puffer (5x):	Tris HCl (625 mM, pH 6,8)	2 ml
	SDS	1 g
	Glycerin	5 ml
	Bromphenolblau	0,5 ml
	β-Mercaptoethanol	0,5 ml
	Aqua dest.	<i>ad</i> 10 ml
Laufpuffer (1x):	Tris Ultrapure	3,0 g
	Glycin	14,4 g
	SDS	1,0 g
	Aqua dest.	<i>ad</i> 1 000 ml
Lysepuffer zur Kernisolation:	Lysispuffer	985 µl
	SDS (10 %)	10 µl
	DTT (100 mM)	5 µl
Lysepuffer zur Proteinisolation:	Lysispuffer	1 ml
	Aprotinin (1,9 mg/ml)	5,2 µl
	Leupeptin (0,5 mg/ml)	2 µl
	Orthovanadat (100 mM)	10 µl
	PMSF (100 mM)	10 µl

Lysispuffer:	HEPES	2,38 g
	NaCl	1,75 g
	EDTA	58,5 mg
	Triton® X-100	2 ml
	Glycerin (wasserfrei)	20 ml
	NaOH	bis pH 7,4
	Aqua dest.	<i>ad</i> 200 ml
Nonidet P-40 10 %:	Nonidet P-40 100 %	100 µl
	Aqua dest.	<i>ad</i> 1 ml
PBS/PIB:	PIB	0,5 ml
	PBS	<i>ad</i> 10 ml
PIB:	NaF	156 mg
	β-Glycerophosphat	1,65 g
	4-Nitrophenylphosphat	3,45 g
	Orthovanadat	93 mg
	Aqua dest.	<i>ad</i> 30 ml
TBS, pH 7,5 (10x):	Tris Ultrapure	121,1 g
	NaCl	87,7 g
	HCl	bis pH 7,5
	Aqua dest.	<i>ad</i> 1 000 ml
TBS-T (1x):	TBS, pH 7,5 (10x)	100 ml
	Tween® 20	1 ml
	Aqua dest.	<i>ad</i> 1 000 ml
Tris HCl, pH 6,8 (500 mM):	Tris Ultrapure	30,3 g
	HCl	bis pH 6,8
	Aqua dest.	<i>ad</i> 500 ml
Tris HCl, pH 6,8 (625 mM):	Tris HCl	9,85 g
	NaOH	bis pH 6,8
	Aqua dest.	<i>ad</i> 100 ml

Tris HCl, pH 8,5 (1 M):	Tris HCl	15,76 g
	NaOH	bis pH 8,5
	Aqua dest.	<i>ad</i> 100 ml
Tris HCl, pH 8,8 (1,5 M):	Tris Ultrapure	181,7 g
	HCl	bis pH 8,8
	Aqua dest.	<i>ad</i> 1 000 ml
Trypsin/EDTA (1x):	Trypsin/EDTA 0,5 % (10x)	5 ml
	PBS	<i>ad</i> 50 ml

2.1.4 Chemikalien

4-Nitrophenylphosphat	AppliChem, Darmstadt
Aprotinin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
APS	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Aqua dest.	Braun Melsungen, Melsungen
β -Glycerophosphat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
β -Mercaptoethanol	Ferak, Berlin
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DMSO	AppliChem, Darmstadt
DTT	AppliChem, Darmstadt
EDTA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethanol	Zentralapotheke, Rostock
Glycerin (wasserfrei)	AppliChem, Darmstadt
Glycin	AppliChem, Darmstadt
GW9662	Enzo Life Sciences, Lörrach
H ₂ O ₂	AppliChem, Darmstadt
HCl	AppliChem, Darmstadt
HEPES	Ferak, Berlin
Isopropanol	Walter-CMP, Kiel
Leupeptin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Lovastatin-Lacton von <i>Aspergillus sp.</i>	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Lovastatin-Säure	Toronto Research Chemicals, Toronto (Kanada)

Luminol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Methanol	J. T. Baker, Deventer (Niederlande)
Milchpulver (<i>Blotting Grade Blocker</i>)	Bio-Rad, München
Na ₂ MoO ₄	Sigma Aldrich, Taufkirchen
NaCl	AppliChem, Darmstadt
NaF	AppliChem, Darmstadt
NS-398	Enzo Life Sciences, Lörrach
NaOH	Lachema/Chemapol, Prag (Tschechien)
Nonidet P-40	Enzo Life Sciences, Lörrach
Orthovanadat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
PBS ohne Ca und Mg	PAN Biotech, Aidenbach
p-Cumarinsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PMSF	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Rotiphorese® Gel 30	Carl Roth, Karlsruhe
SDS	AppliChem, Darmstadt
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe
Tris HCl	AppliChem, Darmstadt
Tris Ultrapure	AppliChem, Darmstadt
Triton® X-100	Carl Roth, Karlsruhe
Trypsin-EDTA 0,5 % (10x)	Life Technologies, Darmstadt
Tween® 20	Carl Roth, Karlsruhe
WST-1-Reagenz	Roche, Grenzach-Wyhlen

2.1.5 Proteinmarker

Prestained SDS-PAGE Standards, Broad Range	Bio-Rad, München
--	------------------

2.1.6 Antikörper

2.1.6.1 Primärantikörper

Tab. 2-1: Verwendete Primärantikörper und ihre Verdünnung

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Bezugsquelle
Anti-β-Actin	Maus	1:10000	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Anti-Caspase-3	Kaninchen	1:2000	Cell Signaling Technology, Leiden (Niederlande)
Anti-Cleaved Caspase-3	Kaninchen	1:200	Cell Signaling Technology, Leiden (Niederlande)
Anti-Cleaved PARP	Kaninchen	1:100	Cell Signaling Technology, Leiden (Niederlande)
Anti-COX-2	Maus	1:250	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-Lamin A/C	Maus	1:400	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
Anti-Lamin B1	Maus	1:1000	Abcam plc, Cambridge (UK)
Anti-PARP	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling Technology, Leiden (Niederlande)
Anti-PPAR γ	Kaninchen	1:100	Biomol GmbH, Hamburg
Anti-PPAR γ	Maus	1:100	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg

2.1.6.2 Sekundärantikörper

Tab. 2-2: Verwendete Sekundärantikörper und ihre Verdünnung

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Bezugsquelle
Alexa Fluor 488 Goat Anti-Mouse IgG	Ziege	1:1000	Life Technologies Corporation, Darmstadt
Alexa Fluor 555 Goat Anti-Rabbit IgG	Ziege	1:1000	Life Technologies Corporation, Darmstadt
Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody	Pferd	1:1000	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody	Ziege	1:1000	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main

2.1.7 Kommerzielle Testsysteme

15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ ₂ EIA Kit	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach
PGD ₂ -MOX EIA Kit	Cayman Chemical Company, Ann Arbor, (MI, USA)
PGE ₂ EIA Kit - Monoclonal	Cayman Chemical Company, Ann Arbor (MI, USA)
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA, USA)

2.1.8 Verbrauchsmaterialien

24-Well-Kulturplatten	BD Biosciences, Heidelberg
4-Well Culture Slides	Corning, Kaiserslautern
6-Well-Kulturplatten	BD Biosciences, Heidelberg
96-Well-Kulturplatten	BD Biosciences, Heidelberg
96-Well-Platten	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Combitips (Multipettenaufsätze)	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Fast Read Objektträger	Biosigma, Cona (Italien)
Glaspasteurpipetten	Carl Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürnberg
Reagiergefäße (0,5 ml, 1,5 ml und 2,0 ml)	Sarstedt, Nürnberg
Rotilabo Blottingpapiere	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Seropipetten (5 ml, 10 ml und 25 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Whatman Nitrocellulosemembran (0,2 μ m)	Carl Roth, Karlsruhe
Zellkulturflaschen (75 cm ²)	Sarstedt, Nürnberg
Zellkulturschalen (100 x 20 mm)	Sarstedt, Nürnberg
Zentrifugenröhrchen (15 und 50 ml)	Sarstedt, Nürnberg

2.1.9 Geräte

Anthos HTII Plattenreader	Anthos Labtec Instruments, Salzburg (Österreich)
Beleuchtungseinrichtung HXP 120 C	Carl Zeiss Microscopy, Jena
CO ₂ -Inkubator CB 210	Binder, Tuttlingen
Fluoreszenzmikroskop Axio Scope.A1	Carl Zeiss Microscopy, Jena

Gelelektrophorese-Kammer

- Mini-PROTEAN Tetra Cell System

Bio-Rad, München

Lichtmikroskop PrimoVert

Carl Zeiss Microscopy, Jena

Molecular Imager ChemiDoc XRS System

Bio-Rad, München

Neubauer-Zählkammer

Marienfeld, Lauda-Königshofen

Trans-Blot Cells

Bio-Rad, München

- Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell

- Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell

2.1.10 Software

GraphPad Prism 5.00

GraphPad Software, San Diego (CA, USA)

Quantity One 1-D Analysis Software

Bio-Rad, München

ZEN 2012 Software

Carl Zeiss Microscopy, Jena

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Kultivierung von Zellen

2.2.1.1.1 Allgemeine Bedingungen

Bei den verwendeten A549- und H358-Zellen handelt es sich um adhärente Lungenkarzinomzellen, die in Zellkulturflaschen mit einer Fläche von 75 cm² kultiviert wurden. Das Kultivieren erfolgte in einem im Folgenden als DMEM-*(Dulbecco's Modified Eagle's Medium-)*Komplettmedium bezeichneten Medium, bestehend aus DMEM (mit 4,5 g/l Glukose und 4 mM L-Glutamin) mit 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 10 % fetalem Kälberserum (FKS). Die Inkubation der Zellen erfolgte in einem CO₂-Inkubator bei 37°C und einer CO₂-Konzentration von 5 % in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre. Passagierung, Aussaat und Stimulation erfolgten mit auf 37°C vorgewärmten Medien in einer Zellkulturwerkbank.

2.2.1.1.2 Passagieren von Zellen

Vor Erreichen der Konfluenz, also bei etwa 70 000 bis 100 000 Zellen pro cm², wurde das Passagieren bzw. Splitten der Zellen durchgeführt. Das heißt, es wurde eine neue Subkultur in frischem DMEM-Komplettmedium angelegt. Bei A549-Zellen wurde alle drei bis vier Tage, bei H358-Zellen alle sieben Tage gesplittet.

Zunächst wurde das alte Medium vorsichtig abgesaugt und die Zellen wurden gründlich mit 5 ml vorgewärmtem PBS gewaschen, um die anschließende Trypsinierung nicht durch serumhaltiges Medium zu inhibieren. Nach gründlichem Absaugen erfolgte die Hinzugabe von ca. 3 ml Trypsin/EDTA (1x) und die Zellen wurden für drei bis vier Minuten bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Trypsin, eine Pankreasprotease, löst Zell-Matrix-Kontakte, während EDTA als Ca²⁺-Chelator die Zell-Zell-Kontakte vermindert. Um die Zellen komplett vom Flaschenboden zu lösen, wurde vorsichtig gegen die Flasche geklopft und das Ergebnis unter dem Mikroskop kontrolliert. Anschließend wurden ca. 7 ml DMEM-Komplettmedium zum Abstoppen des Prozesses hinzugegeben und die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zentrifugation für fünf Minuten bei 200 x g und Raumtemperatur wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in ca. 7 ml DMEM-Komplettmedium resuspendiert. Nun wurde die Zelldichte bestimmt (siehe 2.2.1.1.3) und es erfolgte die Aussaat der Zellen in neue Zellkulturflaschen mit einer Dichte von 10 000 bis 15 000 Zellen pro cm².

Für die Versuche wurden die Passagen p5-20 bei A549-Zellen und p4-21 bei H358-Zellen verwendet. Dabei wurde die kommerziell erworbene Zellkultur mit p1 bezeichnet.

2.2.1.1.3 Bestimmung der Zelldichte

Zur Bestimmung der Zelldichte wurden ca. 8 µl der Zellsuspension in den Hohlraum einer Neubauer-Zählkammer pipettiert. Es wurden die Zellen in vier Großquadraten gezählt und zur Ermittlung der Zellzahl das arithmetische Mittel gebildet. Bei einem Volumen von 0,1 µl pro Großquadrat konnte die Zelldichte nun nach folgender Formel berechnet werden:

$$\text{Zelldichte} = \frac{\text{Zellzahl}}{0,1 \mu\text{l}} = \text{Zellzahl} \cdot 10\,000 \cdot \text{ml}^{-1}$$

2.2.1.2 Aussaat von Zellen

Für die Versuche wurden die wie unter 2.2.1.1.2 beschrieben gewonnenen Zellen in DMEM-Komplettmedium ausgesät. Die Aussaat erfolgte je nach Versuch in unterschiedliche Kulturgefäße mit davon abhängigen Volumina und Zellzahlen (siehe Tab. 2-3). Anschließend wurden die Zellen für 24 Stunden bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

Tab. 2-3: Kulturgefäß, Volumen und Zellzahl je nach Versuch (Aussaat)

Versuch	Kulturgefäße	Volumen pro Well	Zellzahl pro Well
WST-1-Test	96-Well-Kulturplatten	100 µl	ca. 5 000
Proteinisolation (Zellyse)	6-Well-Kulturplatten	2 ml	ca. 200 000
Prostaglandinbestimmung	24-Well-Kulturplatten	500 µl	ca. 100 000
Fluoreszenzmikroskopie	4-Well Culture Slides	1 ml	ca. 100 000
Kernisolation	Zellkulturschalen	10 ml	ca. 2 000 000

2.2.1.3 Inkubation der Zellen mit Testsubstanzen

Die Inkubation der Zellen mit Testsubstanzen erfolgte in DMEM (mit 4,5 g/l Glukose und 4 mM L-Glutamin), welches 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin, jedoch kein FKS enthielt, und im Folgenden als serumfreies DMEM bezeichnet wird.

Zunächst wurden die Zellen unter dem Lichtmikroskop auf eine ausreichende Zelldichte und mögliche Kontaminationen überprüft. Das alte Medium wurde abgesaugt, die Zellen mit vorgewärmtem PBS vorsichtig gewaschen und serumfreies Medium auf die Zellen gegeben. Die Inkubation erfolgte mit den im Ergebnisteil (siehe Kapitel 3) angegebenen Konzentrationen von Testsubstanzen. Die in DMSO (Lovastatin-Lacton, NS-398, GW9662) oder Ethanol (Lovastatin-Säure) gelösten Testsubstanzen wurden so mit DMSO bzw. Ethanol und PBS verdünnt, dass je Well und Testsubstanz eine Endkonzentration von 0,1 % (v/v) DMSO bzw. Ethanol erreicht wurde. Als Vehikel wurden entsprechende 0,1%ige bis 0,2%ige DMSO-Lösungen (bei Lovastatin-Lacton, NS-398, GW9662) bzw. 0,1%ige Ethanol-Lösungen (bei Lovastatin-Säure) verwendet. Aus Tab. 2-4 sind die jeweiligen Endvolumina zu entnehmen. Bei den Versuchen mit Antagonisten (NS-398, GW9662) erfolgte vor Zugabe von Lovastatin-Lacton eine einstündige Präinkubation mit NS-398 oder GW9662 in den entsprechenden Wells. Die Inkubation

erfolgte bei 37°C und 5 % CO₂. Die Inkubationszeiten sind dem Ergebnisteil (siehe Kapitel 3) zu entnehmen.

Tab. 2-4: Volumen je nach Versuch (Stimulation)

Versuch	Volumen pro Well
WST-1-Test	100 µl
Proteinisolation (Zelllyse)	1 ml
Prostaglandinbestimmung	300 µl
Fluoreszenzmikroskopie	1 ml
Kernisolation	5 ml

2.2.1.4 Messung der Zellviabilität (WST-1-Test)

Zur Quantifizierung der Zellviabilität steht mit dem WST-1-Test ein etabliertes Verfahren zur Verfügung. Hierbei wird den zu untersuchenden Zellen das Tetrazoliumsalz WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-Benzol-Disulfonat) hinzugefügt. In lebenden Zellen wird das rote WST-1 unter Oxidation von NADH zu einem orange bis gelben, löslichen Formazansalz reduziert. Der Farbumschlag kann kolorimetrisch analysiert werden (Ishiyama *et al.* 1993).

Die in 96-Well-Kulturplatten stimulierten Zellen wurden nach ihrer entsprechenden Inkubationszeit mit jeweils 10 µl WST-1-Reagenz versetzt und für 30 bis 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Bei gut sichtbarem Farbumschlag wurde mit dem Anthos HTII Plattenreader die Extinktion bei 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 690 nm gemessen. Durch einen mitgeführten Blank (Well mit zellfreiem Medium und WST-1-Reagenz) wurde die Eigenextinktion des Mediums bestimmt und von den Rohwerten der Proben subtrahiert.

2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1 Proteinisolation (Zelllyse)

Um Proteine auftrennen und gezielt detektieren zu können, wurden sie zunächst aus den Zellen isoliert. Hierzu wurde aus Lysispuffer, Protease- und Phosphataseinhibitoren ein Lysepuffer zur Proteinisolation frisch hergestellt. Der gesamte Aufarbeitungsprozess erfolgte auf Eis.

Zuerst wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit kaltem PBS gewaschen. Nach gründlichem Absaugen wurden auf die Zellen 70 bis 75 µl Lysepuffer zur Proteinisolation

gegeben, die Zellen mittels Gummischaber vom Boden gelöst und im Puffer in 1,5-ml-Reaktionsgefäße überführt. Nach 30 Minuten ständiger Bewegung auf einem Plattformschüttler wurden die Lysate bei 4°C und 10 000 x g für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt, davon 5 µl zur Proteinbestimmung (siehe 2.2.2.3) abgenommen und das Pellet verworfen. Die Proben wurden bei -20°C gelagert.

2.2.2.2 Kernisolation

Zur späteren Western Blot-Analyse von nukleärem PPAR γ erfolgte die Kernisolation der Zellen. Die Zellen in den Zellkulturschalen wurden mit PBS gewaschen und mit 3 ml Trypsin/EDTA (1x), wie in Kapitel 2.2.1.1.2 beschrieben, behandelt. Die Reaktion wurde mit ca. 7 ml DMEM-Komplettmedium gestoppt, die Zellsuspension in ein 50-ml-Zentrifugenröhrchen überführt und mithilfe eines Fast Read Objektträgers jeweils die Zelldichte bestimmt. Die Zellsuspensionen wurden so reduziert, dass jede Suspension die gleiche Anzahl an Zellen enthielt. In einem 15-ml-Zentrifugenröhrchen wurden die Zellsuspensionen bei 4°C und 300 x g für fünf Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und jedes Zellpellet in 5 ml PBS/PIB, einem Gemisch aus Phosphataseinhibitoren, behutsam resuspendiert. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 4°C und 300 x g für fünf Minuten mit Verwerfen des Überstandes. Nun wurde jedes Zellpellet in 1 ml eiskaltem Hypotonischen Puffer (pH 7,5) aufgenommen und in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt, in welchem die Suspension für fünfzehn Minuten unter Kühlung auf Eis ruhte. Danach wurden vorsichtig jeweils 50 µl Nonidet P-40 10 % (v/v) zur Lyse der Zellmembranen hinzugegeben, einmal auf und ab pipettiert und für 30 Sekunden bei 4°C und 10 000 x g zentrifugiert. Der Überstand mit Zytoplasmafragmenten wurde sorgfältig vom Zellkernpellet getrennt und verworfen. Zur Lyse der Kernmembran wurden die Pellets sofort mit 60 µl frisch hergestelltem Lysepuffer zur Kernisolation vermischt, gründlich resuspendiert und für 30 Minuten unter Kühlung auf Eis geschüttelt. Die Suspension wurde bei 4°C und 10 000 x g für zehn Minuten zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt, wovon 5 µl zur Proteinbestimmung (siehe 2.2.2.3) verwendet wurden. Das Pellet mit den Kernmembranfragmenten wurde verworfen. Die Proben wurden bei -80°C aufbewahrt.

2.2.2.3 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde mit dem Pierce BCA Protein Assay Kit durchgeführt. Bei Anwesenheit von Proteinen wird in basischem Milieu Cu^{2+} zu Cu^+ reduziert, welches mit Bicinchoninsäure (BCA, *bicinchoninic acid*) eine violette Farbe ergibt und photometrisch analysiert werden kann (Smith *et al.* 1985).

Zunächst wurde ein Albumin-Standard der Konzentration 2 mg/ml im Verhältnis 1:1 mit Aqua dest. verdünnt und mit der hieraus entstandenen Stammlösung der Konzentration 1 mg/ml eine Verdünnungsreihe zur Erstellung einer Eichgeraden hergestellt (siehe Tab. 2-5).

Tab. 2-5: Pipettierschema zur Erstellung einer Eichgeraden zur Proteinbestimmung (ausreichend für zwei Platten)

Albumin Konzentration in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	μl Stammlösung (1 mg/ml)	μl Aqua dest.
1,00	40	0
0,80	40	10
0,60	30	20
0,40	20	30
0,20	10	40
0,10	10	90
0,04	10	240
0,02	10	490
0	0	40

Dann wurden die zur Bestimmung des Proteingehalts abgenommenen 5 μl der Proben im Verhältnis 1:10 mit Aqua dest. verdünnt. Nun wurden jeweils 10 μl der Ansätze für die Verdünnungsreihe doppelt und der Proben dreifach in eine 96-Well-Platte aufgetragen. Das im Kit enthaltene BCA Reagent A wurde mit dem BCA Reagent B im Verhältnis 50:1 gemischt und von dem entstandenen BCA Working Reagent wurden jeweils 200 μl in jedes Well pipettiert. Die Platte wurde kurz geschüttelt und nach 30 Minuten Inkubation bei 37°C wurde mit dem Anthos HTII Plattenreader die Extinktion bei 570 nm gemessen. Mittels der Eichgeraden konnte dann unter Berücksichtigung der Verdünnung auf die jeweilige Gesamtproteinkonzentration der Proben in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ geschlossen werden.

2.2.2.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mithilfe der SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) können Proteine nach ihrer Molekülmasse elektrophoretisch aufgetrennt werden. Dabei werden die Proben in einem netzartigen SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen, an welchem eine Spannung

angelegt wird. Durch Zusatz des anionischen Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS, *sodium dodecyl sulfate*) werden die Proteine denaturiert und erhalten alle die gleiche negative Ladung, sodass die Proteine zur Anode wandern und sich allein nach der Molekülmasse auftrennen. Hierbei gilt, dass große Proteine durch die netzartige Gelstruktur bedingt langsamer und in einer bestimmten Zeit somit weniger weit wandern als kleine Proteine.

Zunächst wurden 10%ige SDS-Polyacrylamid-Gele hergestellt, die aus einem Sammelgel und einem Trenngel bestanden (siehe Tab. 2-6).

Tab. 2-6: Ansätze für je zwei 10%ige Gele

	Trenngel (10 %)		Sammelgel (4 %)	
	1 mm	1,5 mm	1 mm	1,5 mm
Aqua dest.	4,05 ml	6,075 ml	3,05 ml	4,575 ml
Tris HCl, pH 8,8 (1,5 M)	2,5 ml	3,75 ml	-	-
Tris HCl, pH 6,8 (500 mM)	-	-	1,25 ml	1,875 ml
SDS (10 % (w/v))	100 µl	150 µl	50 µl	75 µl
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	3,3 ml	4,95 ml	670 µl	1,005 ml
TEMED	5 µl	7,5 µl	5 µl	7,5 µl
APS (10 % (w/v))	50 µl	75 µl	25 µl	37,5 µl

Nach der Polymerisierung wurden die Gele in Gelelektrophorese-Kammern eingespannt und von Laufpuffer (1x) umspült.

Nach der Proteinbestimmung wurden die Proben so mit Aqua dest. verdünnt, dass schließlich alle die gleiche Menge an Gesamtprotein aber maximal 50 µg pro Probe enthielten. Die Proben wurden nun mit 5 µl (bei 1-mm-Gelen) bzw. 10 µl (bei 1,5-mm-Gelen) Lämmli-Puffer (5x) vermischt und für zehn Minuten bei 95°C im Heizblock denaturiert. Nach Abkühlen wurden die Proben sowie als Größenmarker 3 µl Prestained SDS-PAGE Standards, Broad Range, sorgfältig in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Stromstärke von zunächst 15 mA. Sobald die Laufront, markiert durch das im Lämmli-Puffer enthaltene Bromphenolblau, das Trenngel erreichte, wurde die Stromstärke auf 25 mA erhöht. Die Elektrophorese wurde beendet, sobald die Laufront das Ende des Trenngels erreichte. Sofort im Anschluss erfolgte der Western Blot.

2.2.2.5 Western Blot

Durch Western Blotting wurden die Proteine vom instabilen Gel auf eine Nitrocellulosemembran transferiert, damit anschließend die Immundetektion der Proteine erfolgen konnte. Das Western Blotting erfolgte nach dem Tank-Blot-Prinzip. Nur die Caspase- und PARP-Blots wurden nach dem Semi-Dry-Prinzip geblottet.

Beim Tank-Blot-Verfahren erfolgte der Aufbau des sogenannten Western Blot-Sandwiches in einer mit Blotpuffer (1x) gefüllten Wanne unter Vermeidung von Blasen in folgender Reihenfolge: Kathode, zwei Schwämme, Filterpapier, SDS-Polyacrylamid-Gel, Nitrocellulosemembran, Filterpapier, ein Schwamm, Anode. Dabei waren alle Komponenten von Blotpuffer durchtränkt. Die durch das SDS negativ geladenen Proteine wandern zur Anode und werden durch hydrophobe Wechselwirkungen an der Nitrocellulosemembran festgehalten. Das Western Blot-Sandwich wurde in eine mit Blotpuffer (1x) und einem Eisakku gefüllte Tank-Blot-Kammer gespannt und anschließend erfolgte der Transfer für zwei Stunden bei 200 mA pro Gel.

Beim Semi-Dry-Verfahren wurde das Western Blot-Sandwich in folgender Reihenfolge im trockenen Semi-Dry-System zusammengesetzt: Anode, Filterpapier, Nitrocellulosemembran, SDS-Polyacrylamid-Gel, Filterpapier, Kathode. Dabei wurden die einzelnen Komponenten zuvor mit Blotpuffer angefeuchtet.

Im Semi-Dry-System erfolgte dann für eine Stunde bei maximal 120 mA pro Gel und 15 V der Transfer.

Im Anschluss wurde die Membran in ein 50-ml-Zentrifugenröhrchen transferiert und einige Minuten auf dem Rollmixer mit etwa 5 ml TBS-T (1x) gewaschen, um dann mit der Vorbereitung zur Immundetektion von Proteinen fortzufahren.

2.2.3 Immunologische Methoden

2.2.3.1 Immundetektion von Proteinen und Chemilumineszenz-Analyse

Nach dem Western Blot wurden die Membranen in 50-ml-Zentrifugenröhrchen für eine Stunde in 5 ml Blockierungslösung (Milchpulver 5 % (w/v)) auf dem Rollmixer inkubiert, um unspezifische Bindungen der im Folgenden hinzugegebenen Antikörper an die Membran zu verhindern. Es folgte ein Waschvorgang von zweimal zehn Minuten mit

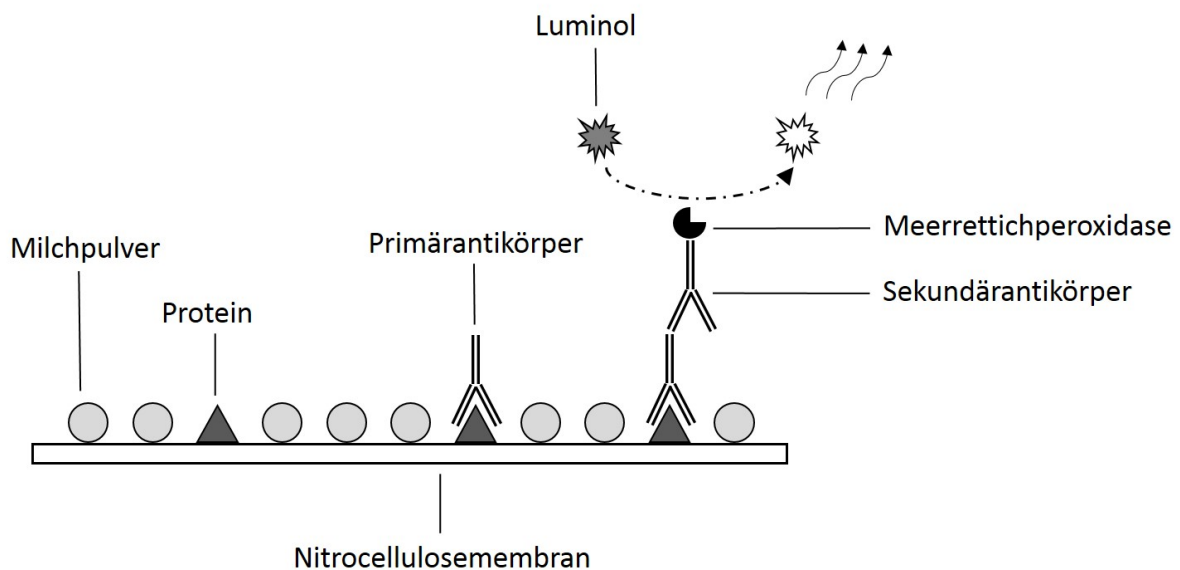


Abb. 2-1: Schematische Darstellung der Bindung von Primär- und Sekundärantikörper

Durch Bindung von Primärantikörper und mit Meerrettichperoxidase-gekoppeltem Sekundärantikörper an das Zielprotein erfolgt bei Zugabe von Luminol die Chemilumineszenzreaktion.

TBS-T (1x) und die Membranen wurden über Nacht bei 4°C mit einem spezifischen Primärantikörper inkubiert, der in etwa 5 ml 1%igem (w/v) Milchpulver gelöst war. Dabei bindet der Primärantikörper spezifisch an die jeweilige Proteinbande auf der Membran. Nach einem erneuten Waschvorgang von zweimal zehn Minuten mit TBS-T (1x) folgte für eine Stunde bei Raumtemperatur die Inkubation mit einem passenden Sekundärantikörper, der in etwa 5 ml 1%igem (w/v) Milchpulver gelöst war. Dieser bindet an den Fc-Teil des Primärantikörpers. Der Sekundärantikörper selbst hat am Fc-Teil eine Meerrettichperoxidase gebunden, welche die Chemilumineszenzreaktion von Luminol katalysiert (siehe Abb. 2-1). Nach zweimal zehn Minuten Waschen mit TBS-T (1x) wurden etwa 2 ml ECL-Lösung gleichmäßig auf der Membran verteilt. Die ECL-Lösung, welche unter anderem Luminol enthält, war kurz vorher aus ihren Komponenten (ECL-Lösung I und II im Verhältnis 1:1) hergestellt und auf Raumtemperatur erwärmt worden. Die Chemilumineszenzreaktion wurde mittels Molecular Imager ChemiDoc XRS System detektiert und mit der Quantity One 1-D Analysis Software (Bio-Rad, München) analysiert. Außerdem wurde von der belichteten Membran ein Schwarz-Weiß-Foto aufgenommen, auf dem der Größenstandard zur Abschätzung der Molekularmasse abgebildet war (siehe Abb. 2-2). Abschließend wurde die Membran einige Minuten mit TBS-T (1x) gewaschen.

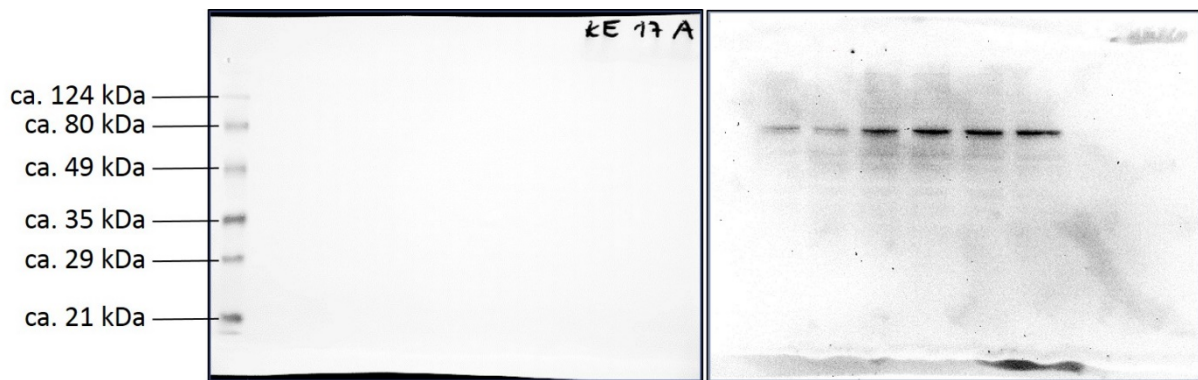


Abb. 2-2: Beispiel von Schwarz-Weiß-Foto mit Proteinmarker (links) und Chemilumineszenz-Bild (rechts) bei COX-2-Nachweis

Die COX-2 hat eine Molekularmasse von etwa 70 kDa und liegt somit zwischen den Markerbanden von ca. 49 kDa und ca. 80 kDa.

2.2.3.2 Strippen und Aufbewahren von Membranen

Meist wurden auf einer Membran nacheinander mehrere Proteine untersucht. Deswegen mussten die vorhandenen Antikörper zunächst von der Membran entfernt werden. Dazu wurden die Membranen zweimal zwanzig Minuten mit ca. 5 ml Glycin-Stripp-Puffer (1x) gewaschen. Es folgte ein Waschvorgang für fünf Minuten mit TBS-T (1x). Sollte gleich im Anschluss ein weiteres Protein untersucht werden, wurde die immunologische Detektion (siehe 2.2.3.1) beginnend mit der Blockierung wiederholt. Ansonsten wurden die Membranen zur Aufbewahrung vorbereitet: Nach einem einstündigen Waschvorgang mit Aqua dest. wurden sie bei Raumtemperatur getrocknet und in Folie bei 4°C asserviert. Sollte zu einem späteren Zeitpunkt erneut ein Protein untersucht werden, konnte die Membran durch Waschen mit Aqua dest. für zwanzig Minuten und mit TBS-T (1x) für fünf Minuten reaktiviert werden. Daran schloss sich die Inkubation in Blockierlösung (siehe 2.2.3.1) an.

2.2.3.3 Prostaglandinbestimmung (ELISA)

Die Prostaglandinbestimmungen erfolgten aus den Überständen von in 24-Well-Kulturplatten inkubierten Zellen.

Es wurden die Prostaglandine (PG) 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂ (15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂ EIA Kit), PGD₂ (PGD₂-MOX EIA Kit) und PGE₂ (PGE₂ EIA Kit - Monoclonal) analysiert und dabei wurde nach den Vorschriften der Hersteller vorgegangen. Die Nachweise erfolgten mittels kompetitiven *Enzyme Linked Immunosorbent Assays* (ELISA).

Zusammengefasst konkurrieren dabei die Prostaglandine mit Enzym-gekoppelten Tracern um an den Plattenboden gebundene Antikörper. Das Enzym, je nach Assay Acetylcholinesterase oder Alkalische Phosphatase, vermittelt bei Zugabe seines Substrats eine Farbreaktion, deren Intensität mit einem Plattenreader gemessen werden kann. Die Intensität ist dabei umgekehrt proportional zur PG-Konzentration. Mithilfe einer Eichgeraden kann auf die PG-Konzentration der Proben geschlossen werden.

Nachdem der Überstand von den Zellen entfernt war, wurden die Zellen zudem lysiert (siehe 2.2.2.1) und der Proteingehalt bestimmt (siehe 2.2.2.3). Die Darstellung der PG-Ergebnisse erfolgte ausschließlich auf den jeweiligen Proteingehalt normalisiert.

2.2.3.4 Fluoreszenzmikroskopie

Nach der gewünschten Inkubationszeit wurden die Zellen in den 4-Well Culture Slides vorsichtig mit 500 µl kaltem PBS gewaschen und in jedes Well zur Zellfixierung 500 µl Paraformaldehyd 4 % (v/v) gegeben. Nach 30 Minuten wurden die Zellen dreimal behutsam mit 500 µl kaltem PBS gewaschen und danach für eine Stunde bei Raumtemperatur mit 200 µl einer PBS-Lösung, die 5 % (v/v) FKS und 0,3 % (v/v) Triton® X-100 enthielt, blockiert. Es schloss sich ein erneuter Waschvorgang an, bei dem dreimal vorsichtig kaltes PBS auf die Zellen gegeben und wieder abgesaugt wurde. Nun folgte die Zugabe von 200 µl einer PBS-Lösung mit 1 % (v/v) FKS und 0,3 % (v/v) Triton® X-100 sowie den Primärantikörpern gegen Lamin A/C (Maus) zur Darstellung der Zellkerne und gegen PPAR γ (Kaninchen). Nach einer einstündigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur und nochmals dreimaligem Waschen mit PBS wurden jetzt 200 µl einer Lösung mit den Sekundärantikörpern goat anti-mouse Alexa Fluor 488 labelled IgG zum Nachweis von Lamin A/C (grün) und goat anti-rabbit Alexa Fluor 555 labelled IgG zum Nachweis von PPAR γ (rot) auf die Zellen gegeben. Diese waren zuvor im Dunkeln in einer PBS-Lösung mit 1 % (v/v) FKS und 0,3 % (v/v) Triton® X-100 verdünnt worden. Auch die einstündige Inkubationszeit erfolgte im Dunkeln und bei Raumtemperatur. Es schloss sich ein dreimaliger Waschvorgang mit PBS an, die Wells wurden sorgfältig abgesaugt und die Kammerwände vom Objektträger getrennt. Jedes Feld wurde mit einem Tropfen Glycerin 20 % (v/v) benetzt, der Objektträger mit einem Deckglas versehen und unter dem Fluoreszenzmikroskop angeschaut. Es wurden jeweils Aufnahmen der grün markierten Zellkerne (Lamin A/C) sowie des rot markierten PPAR γ gemacht und diese paarweise überlagert. Zur Analyse der PPAR γ -Translokation vom

Zytosol in den Zellkern wurde die Intensität von PPAR γ innerhalb Lamin A/C-positiver Areale detektiert und mit der ZEN 2012 Software analysiert.

Die Objektträger wurden im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt.

2.2.4 Statistik

Alle statistischen Analysen erfolgten mit dem Programm GraphPad Prism 5.0. Die Vergleiche zwischen den Gruppen wurden mit der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) plus Dunnett- bzw. Bonferroni-Test oder dem zweiseitigen t-Test nach Student durchgeführt. Bei $p < 0,05$ wurde das Ergebnis als statistisch signifikant erachtet.

Bei einer unterschiedlichen Anzahl an Experimenten, die mit unterschiedlichen Konzentrationen durchgeführt wurden (siehe Abb. 3-1), enthalten die Vehikelkontrollen in den Histogrammen keine SEM (*standard error of the mean*). Die statistische Auswertung erfolgte jedoch nur mit den jeweils zugehörigen Vehikelkontrollen.

IC₅₀-Werte wurden durch nichtlineare Regression von $\log(\text{Inhibitor})$ (X) vs. Viabilität (Y) nach der 4PL (*four-parameter logistic curve*) ermittelt. Die nichtlineare Regression wurde nach der Gleichung

$$Y = \min + \frac{\max - \min}{1 + 10^{[(\log \text{IC}_{50} - X) \cdot \text{HillSlope}]}}$$

erstellt, wobei die vier Parameter *min* (unterer Grenzwert der Viabilität), *max* (oberer Grenzwert der Viabilität), IC₅₀ (Konzentration des Inhibitors bei einer Viabilität genau auf der Hälfte zwischen *min* und *max*) und HillSlope (Grad des Abfalls der Viabilität bei Anstieg der Konzentration des Inhibitors) mithilfe von GraphPad Prism 5.0 ermittelt wurden.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss von Lovastatin-Lacton und -Säure auf die Zellviabilität

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte bereits durch Lovastatin-Lacton eine Hemmung der Zellviabilität in A549-Zellen nachgewiesen werden. Zur weiteren Untersuchung wurden A549- und H358-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Lovastatin-Lacton (0,1 bis 75 μM) und Lovastatin-Säure (0,1 bis 125 μM) inkubiert. Nach 48 Stunden wurde mittels WST-1-Test die Viabilität ermittelt. Die Durchführung des Versuchs erfolgte in Zusammenarbeit mit PD Dr. med. Udo Walther.

In beiden Zelllinien wurde ab einer Konzentration von 30 μM Lovastatin-Lacton ein signifikanter Abfall der Viabilität gemessen (siehe Abb. 3-1, A und B), wobei bei 75 μM Minimalwerte von $53 \pm 5 \%$ bei A549- und von $36 \pm 3 \%$ bei H358-Zellen erreicht wurden. IC_{50} -Werte des Lovastatin-Lacton-induzierten Effekts auf die Viabilität waren 76,7 μM bei A549- und 45,2 μM bei H358-Zellen.

Lovastatin-Säure hingegen zeigte nur bei einer Konzentration von 1 μM bei A549-Zellen einen leichten, signifikanten Abfall, der aber bei höheren Konzentrationen ausblieb (siehe Abb. 3-1, C und D). IC_{50} -Werte der Säure waren somit nicht ermittelbar.

3.2 Einfluss von Lovastatin-Lacton und -Säure auf die Apoptose

3.2.1 DNA-Fragmentierung

Bei der Apoptose kommt es unter anderem zu einer DNA-Fragmentierung. Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten konzentrationsabhängig eine Zunahme der DNA-Fragmentierung in A549- und H358-Zellen durch Inkubation mit Lovastatin-Lacton, nicht aber mit Lovastatin-Säure nachweisen. Hierbei war bei A549-Zellen bei 50 μM Lovastatin-Lacton eine Zunahme der DNA-Fragmentierungsrate um das etwa

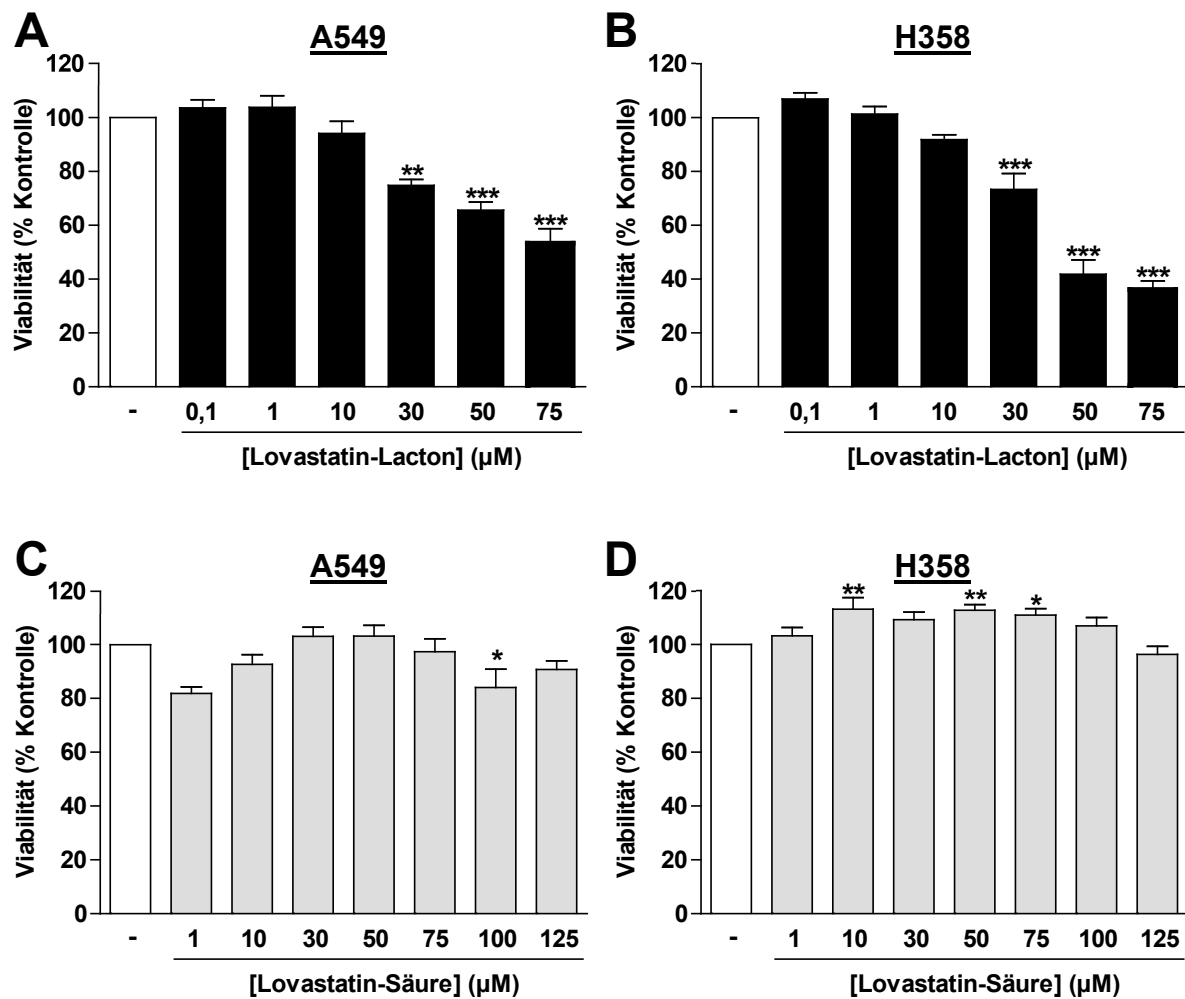


Abb. 3-1: Einfluss von Lovastatin-Lacton und -Säure auf die Viabilität in A549- und H358-Zellen

Die Abbildung zeigt Untersuchungen der Viabilität (WST-1-Test) von A549- (A, C) und H358-Zellen (B, D), die jeweils für 48 Stunden mit den entsprechenden Konzentrationen an Lovastatin-Lacton (A, B) oder -Säure (C, D) bzw. Vehikel inkubiert wurden. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SEM in Prozent der Kontrolle aus $n=3-10$ (A), $n=8-13$ (B), $n=5-11$ (C) und $n=5-15$ (D) Experimenten. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$ vs. entsprechender Vehikelkontrolle (ANOVA plus Dunnett-Test).

Vierfache (428 ± 29 %) und bei H358-Zellen bei $75 \mu\text{M}$ um das etwa Dreifache (282 ± 5 %) zu verzeichnen. Die Versuche wurden mit dem Kit Cell Death Detection ELISA^{PLUS} (Roche Diagnostics, Mannheim) analysiert.

Weitere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass eine spezifische Hemmung sowohl der COX-2 via NS-398 als auch des PPAR γ via GW9662 die Lovastatin-Lacton-induzierte DNA-Fragmentierung aufhebt. Versuche mit COX-2-siRNA resultierten ebenso in einer aufgehobenen DNA-Fragmentierung. Die gleichen Effekte traten ebenfalls beim Lovastatin-Lacton-induzierten Viabilitätsabfall auf (Walther *et al.* 2016).

3.2.2 Caspase und PARP

Zur weiteren Untersuchung des Einflusses von Lovastatin auf die Apoptose wurden im Rahmen dieser Arbeit A549-Zellen mit jeweils 50 μM und H358-Zellen mit jeweils 75 μM Lovastatin-Säure und -Lacton für 48 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert, die Proteine isoliert und die Western Blots auf Caspase-3, cleaved Caspase-3, PARP und cleaved PARP untersucht.

Caspasen und insbesondere die Caspase-3 spielen bei der Apoptose eine wesentliche Rolle. Während dieses Prozesses wird die Caspase-3 in ihre aktive Form, die sogenannte cleaved Caspase-3, gespalten (Fernandes-Alnemri *et al.* 1994). Es ist zudem bekannt, dass aktive Caspasen das Substrat und DNA-Reparatur-Protein PARP zum cleaved PARP spalten (Nicholson *et al.* 1995). Ein Nachweis der cleaved Caspase-3 und des cleaved PARP kann somit als ein Zeichen für die Apoptose gewertet werden.

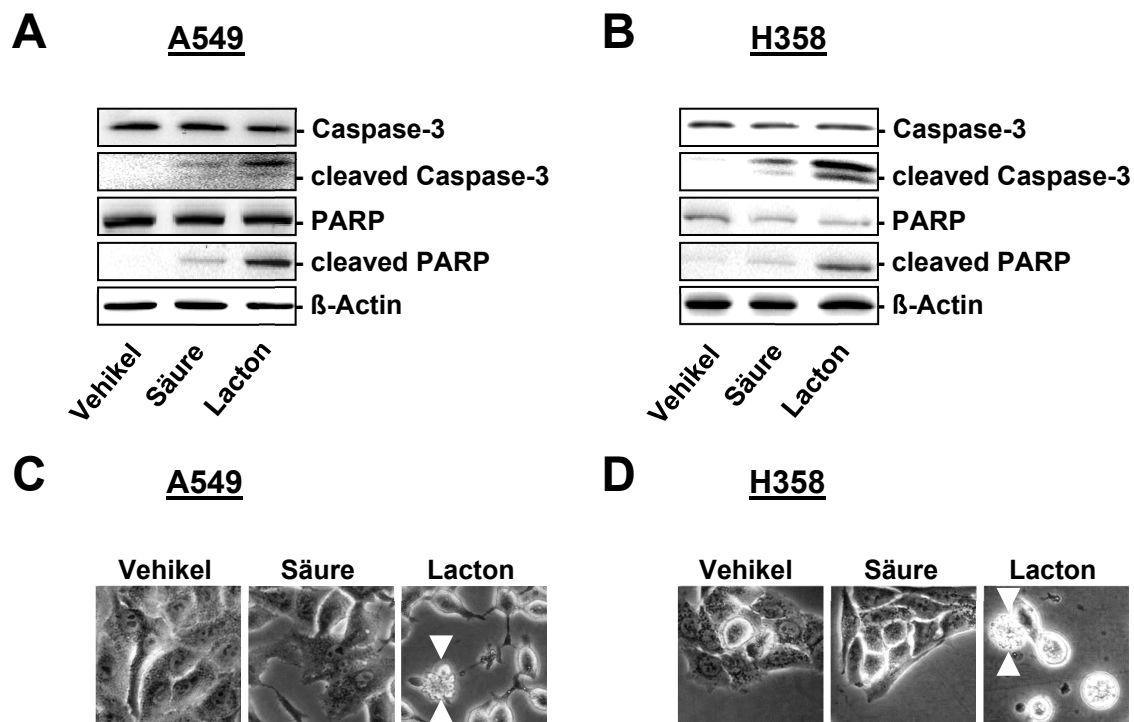


Abb. 3-2: Einfluss von Lovastatin-Lacton und -Säure auf Apoptoseparameter in A549- und H358-Zellen

A, B: Für die Abbildungen wurden Zelllysate von A549- (A) und H358-Zellen (B) mittels Western Blot-Analyse auf Caspase-3, cleaved Caspase-3, PARP und cleaved PARP untersucht. Die Zellen wurden jeweils für 48 Stunden mit 50 μM (A549) bzw. 75 μM (H358) Lovastatin-Säure (Säure) oder -Lacton (Lacton) bzw. Vehikel inkubiert. Die Abbildungen zeigen jeweils einen repräsentativen Blot aus n=4-8 Experimenten. C, D: Dargestellt sind lichtmikroskopische Aufnahmen von A549- (C) und H358-Zellen (D), die für 24 Stunden mit 50 μM (A549) bzw. 75 μM (H358) Lovastatin-Säure (Säure) oder -Lacton (Lacton) bzw. Vehikel inkubiert wurden. Die weißen Pfeilspitzen zeigen auf Zellen mit charakteristischer apoptotischer Morphologie.

In Übereinstimmung mit den Versuchen zur DNA-Fragmentierung wurde angenommen, dass Lovastatin-Lacton, nicht aber Lovastatin-Säure die Apoptose hervorruft und deshalb nur beim Lovastatin-Lacton cleaved Caspase-3 und cleaved PARP nachweisbar sind. Tatsächlich waren sowohl bei den mit Lovastatin-Lacton behandelten A549- als auch H358-Zellen jeweils kräftige Banden von cleaved Caspase-3 und cleaved PARP zu sehen (siehe Abb. 3-2, A und B). Jedoch auch Lovastatin-Säure führte in beiden Zelllinien zu einer leichten, aber im Vergleich zum Lacton schwächeren Darstellung. Eine quantitative Auswertung erfolgte unter Berücksichtigung der geringen bis fehlenden Darstellung von cleaved Caspase-3 und cleaved PARP in den Vehikelansätzen nicht.

3.2.3 Zellmorphologie

Da die Apoptose mit spezifischen morphologischen Veränderungen einhergeht, wurden ebenfalls lichtmikroskopische Aufnahmen angefertigt (siehe Abb. 3-2, C und D). A549-Zellen wurden mit jeweils 50 μM und H358-Zellen mit jeweils 75 μM Lovastatin-Säure bzw. -Lacton für 24 Stunden inkubiert. Die Abbildungen wurden freundlicherweise von Dr. rer. nat. Robert Ramer zur Verfügung gestellt. Nur in den mit Lovastatin-Lacton behandelten Zellen zeigte sich das sogenannte „*membrane blebbing*“ als ein für die Apoptose spezifisches Merkmal (Köhler *et al.* 1990).

3.3 Einfluss von Lovastatin-Lacton auf die COX-2- und PPAR γ -Expression

Da Lovastatin-Säure weder bei den Viabilitätsuntersuchungen noch bei der DNA-Fragmentierung oder bei der visuellen Bewertung per Lichtmikroskop ein höheres apoptotisches Potenzial zeigte, wurde im Folgenden zur Evaluierung des proapoptotischen Mechanismus von Lovastatin nur noch Lovastatin-Lacton untersucht, was nachfolgend als Lovastatin bezeichnet wird.

Ein unter anderem in unserer Arbeitsgruppe ermittelter proapoptotischer Wirkmechanismus liegt in der Hochregulation des Enzyms COX-2 mit nachfolgender Prostaglandin-vermittelter PPAR γ -Aktivierung, welche schließlich eine Apoptose hervorruft (Eichele *et al.* 2008; Eichele *et al.* 2009, 2009; Ramer *et al.* 2013a; Ramer *et*

al. 2013b). Daher wurden die COX-2- und PPAR γ -Expression in Lysaten nach Stimulation mit Lovastatin analysiert.

3.3.1 Konzentrationsabhängige Wirkung von Lovastatin

Unsere Arbeitsgruppe konnte bereits in beiden Zelllinien eine konzentrationsabhängige Induktion der COX-2-mRNA durch Lovastatin feststellen. Dabei wurden nach 48 Stunden Anstiege der COX-2-mRNA im Vergleich zur Kontrolle bei A549-Zellen bei einer Konzentration von 50 μ M auf das etwa Fünffache (546 ± 112 %) und bei H358-Zellen bei einer Konzentration von 75 μ M auf das fast Vierfache (368 ± 41 %) festgestellt.

Um den Einfluss von Lovastatin auf Proteinebene zu untersuchen, wurden A549- und H358-Zellen mit unterschiedlichen Lovastatin-Konzentrationen (1 μ M bis 75 μ M) für 24 Stunden stimuliert und Western Blots der Lysate angefertigt.

Die COX-2-Expression stieg analog zum Verhalten der mRNA mit zunehmender Lovastatin-Konzentration in beiden Zelllinien an. Bei A549-Zellen konnte ein maximaler signifikanter Anstieg bei 75 μ M auf das etwa Dreifache (316 ± 70 %) im Vergleich zur Kontrolle verzeichnet werden (siehe Abb. 3-3, links). Bei H358-Zellen war die COX-2-

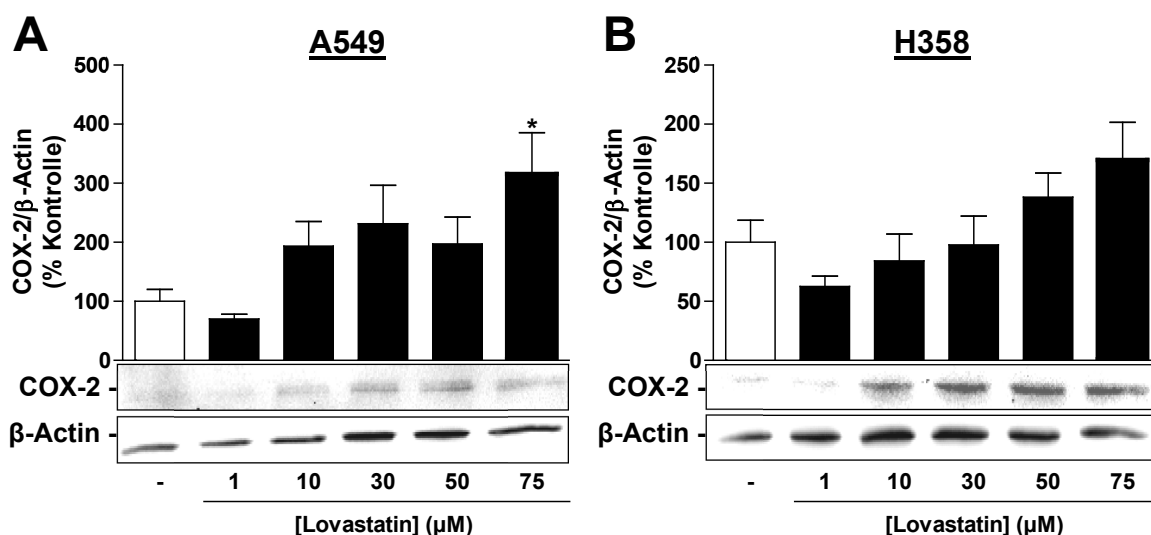


Abb. 3-3: Konzentrationsabhängige Wirkung von Lovastatin-Lacton auf die COX-2-Expression in A549- und H358-Zellen

Die Abbildung zeigt Western Blot-Analysen aus Lysaten von A549- (A) und H358-Zellen (B), die jeweils für 24 Stunden mit den entsprechenden Konzentrationen an Lovastatin-Lacton bzw. Vehikel inkubiert wurden. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SEM in Prozent der Kontrolle aus $n=4$ Experimenten. Die densitometrischen Werte wurden auf die jeweilige β -Actin-Menge bezogen dargestellt. * $p<0,05$ vs. entsprechender Vehikelkontrolle (ANOVA plus Dunnett-Test). Für die unteren Teilabbildungen wurde jeweils ein repräsentativer Western Blot von vier Blots ausgewählt.

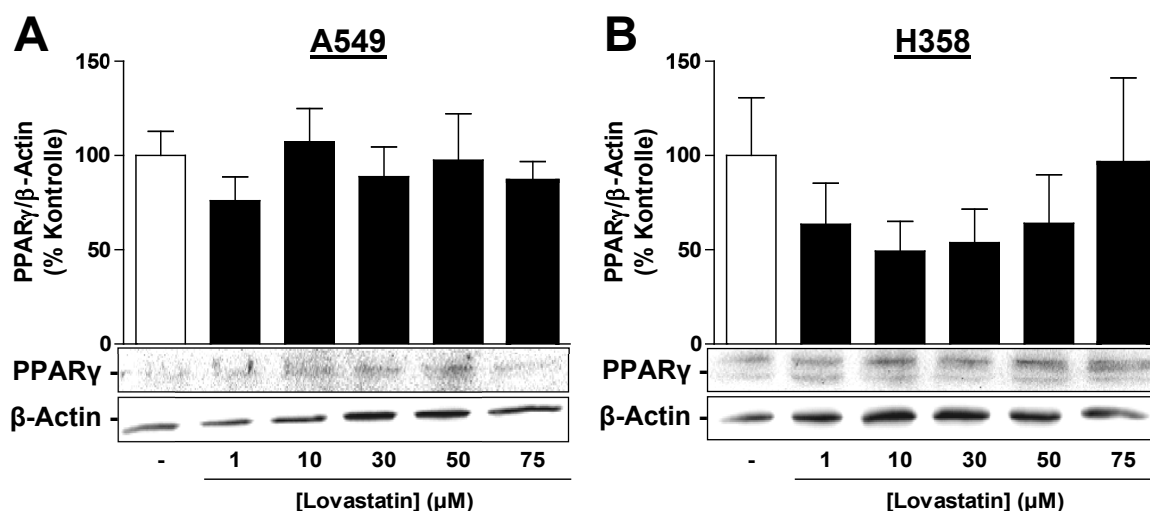


Abb. 3-4: Konzentrationsabhängige Wirkung von Lovastatin-Lacton auf die PPAR γ -Expression in A549- und H358-Zellen

Die Abbildung zeigt Western Blot-Analysen aus Lysaten von A549- (A) und H358-Zellen (B), die jeweils für 24 Stunden mit den entsprechenden Konzentrationen an Lovastatin-Lacton bzw. Vehikel inkubiert wurden. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SEM in Prozent der Kontrolle aus $n=4$ Experimenten. Die densitometrischen Werte wurden auf die jeweilige β -Actin-Menge bezogen dargestellt. Signifikante Unterschiede wurden zwischen den Gruppen nach Varianzanalyse (ANOVA plus Dunnett-Test) nicht gefunden. Für die unteren Teilabbildungen wurde jeweils ein repräsentativer Western Blot von vier Blots ausgewählt.

Expression ebenfalls bei 75 μ M maximal und betrug fast das Doppelte (170 ± 32 %) im Vergleich zur Kontrolle (siehe Abb. 3-3, rechts).

Bei der PPAR γ -Expression hingegen konnte bei beiden Zelllinien kein signifikanter Einfluss von Lovastatin festgestellt werden (siehe Abb. 3-4).

3.3.2 Zeitabhängige Wirkung von Lovastatin

Des Weiteren sollte die zeitabhängige Wirkung von Lovastatin auf die COX-2- und PPAR γ -Expression untersucht werden. In unserer Arbeitsgruppe waren hinsichtlich der COX-2 bereits Vorarbeiten auf mRNA-Ebene erfolgt. Dabei war unter anderem eine rasche Induktion von COX-2-mRNA bei A549-Zellen nach sechs Stunden Inkubation mit 50 μ M Lovastatin und bei H358-Zellen nach vier und acht Stunden Inkubation mit 75 μ M Lovastatin zu verzeichnen.

Zur Analyse einer zeitabhängigen Proteinexpression von COX-2 und PPAR γ wurden A549-Zellen mit 50 μ M und H358-Zellen mit 75 μ M Lovastatin stimuliert und Western Blots von Lysaten nach zwei, vier, acht, zwölf, 18, 24 und 48 Stunden angefertigt (siehe Abb. 3-5).

Die PPAR γ -Expression blieb in beiden Zelllinien über den gesamten Zeitverlauf in etwa unverändert im Vergleich zur Kontrolle.

Die COX-2-Expression hingegen stieg in beiden Zelllinien schon nach vier Stunden konzentrationsabhängig an. Bei A549-Zellen wurde ein maximaler Anstieg auf das etwa Zehnfache (1087 ± 399 %) nach 24 Stunden und bei H358-Zellen auf das etwa Fünffache (460 ± 97 %) nach 48 Stunden erreicht. Aber auch zu den meisten anderen Zeitpunkten waren die Anstiege signifikant.

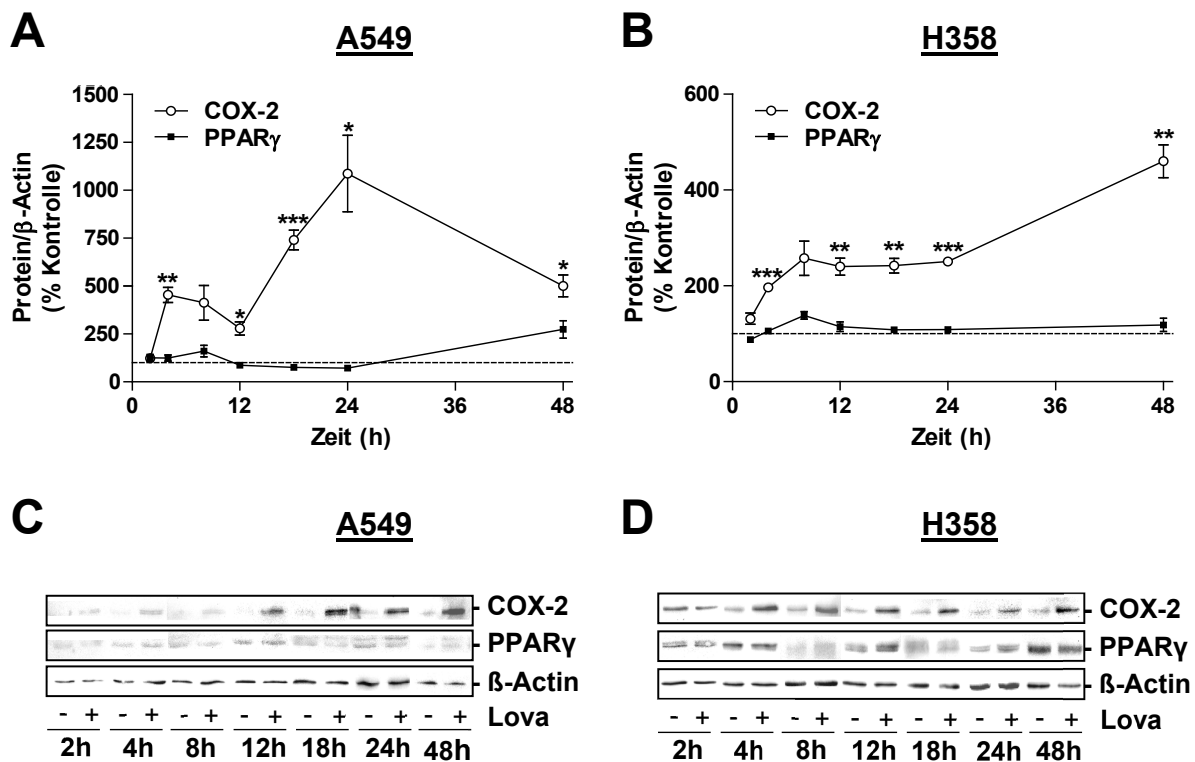


Abb. 3-5: Zeitabhängige Wirkung von Lovastatin-Lacton auf die PPAR γ - und COX-2-Expression in A549- und H358-Zellen

Es sind Western Blot-Analysen von Zelllysaten aus A549- (A) und H358-Zellen (B) sowie jeweils repräsentative Blots (C, D) gezeigt. Die Zellen wurden mit 50 μ M (A549) bzw. 75 μ M (H358) Lovastatin-Lacton (Lova) oder Vehikel für eine unterschiedliche Anzahl an Stunden inkubiert. Untersucht wurden die COX-2- und PPAR γ -Expression. Die Werte der Vehikelansätze sind als gestrichelte Linie gezeigt. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SEM in Prozent der Kontrolle aus n=3-4 (A) und n=4-8 (B) Experimenten. Die densitometrischen Werte wurden auf die jeweilige β -Actin-Menge bezogen dargestellt. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 vs. entsprechender Vehikelkontrolle (t-Test nach Student).

3.4 Wirkung von Lovastatin auf die Prostaglandinsynthese sowie diesbezüglicher Einfluss eines COX-2-Inhibitors

Studien unserer Arbeitsgruppe konnten bereits eine durch Prostaglandine (PG) vermittelte Apoptose in humanen Lungenkarzinomzellen nachweisen (Ramer *et al.* 2013a; Ramer *et al.* 2013b). Um die COX-2-Abhängigkeit des erwarteten PG-Anstiegs zu zeigen, schlossen die Versuche auch die kombinierte Inkubation der Zellen mit Lovastatin und dem selektiven COX-2-Inhibitor NS-398 ein.

A549-Zellen wurden mit 50 μ M und H358-Zellen mit 75 μ M Lovastatin jeweils mit oder ohne 1 μ M NS-398 inkubiert. NS-398 wurde eine Stunde vor Inkubation mit Lovastatin

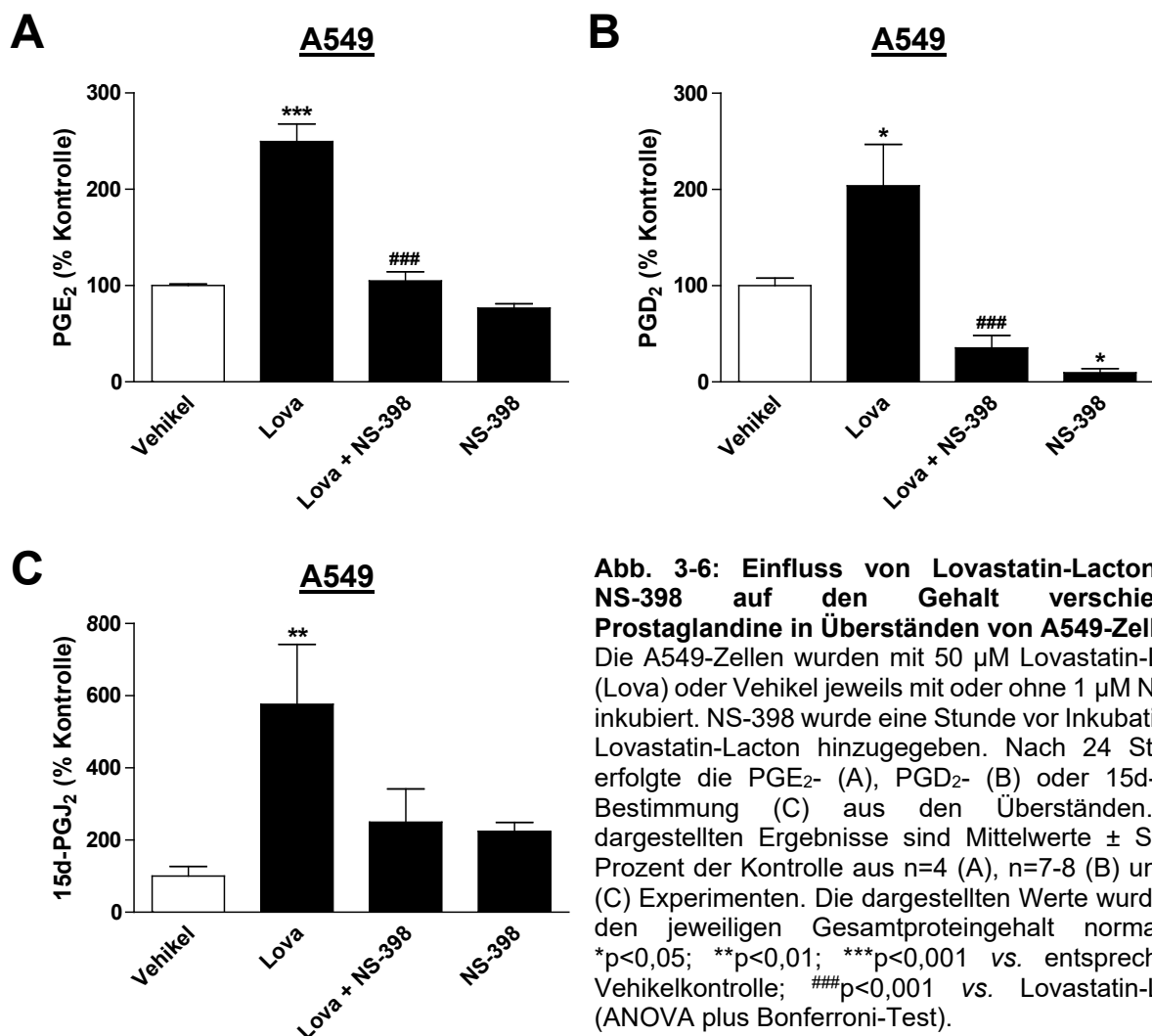


Abb. 3-6: Einfluss von Lovastatin-Lacton und NS-398 auf den Gehalt verschiedener Prostaglandine in Überständen von A549-Zellen

Die A549-Zellen wurden mit 50 μ M Lovastatin-Lacton (Lova) oder Vehikel jeweils mit oder ohne 1 μ M NS-398 inkubiert. NS-398 wurde eine Stunde vor Inkubation mit Lovastatin-Lacton hinzugegeben. Nach 24 Stunden erfolgte die PGE₂- (A), PGD₂- (B) oder 15d-PGJ₂-Bestimmung (C) aus den Überständen. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SEM in Prozent der Kontrolle aus n=4 (A), n=7-8 (B) und n=8 (C) Experimenten. Die dargestellten Werte wurden auf den jeweiligen Gesamtproteingehalt normalisiert. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 vs. entsprechender Vehikelkontrolle; ###p<0,001 vs. Lovastatin-Lacton (ANOVA plus Bonferroni-Test).

hinzugegeben. Nach 24 Stunden wurden die Spiegel von PGE_2 , PGD_2 und 15-d-PGJ_2 in den Überständen bestimmt.

In beiden Zelllinien stiegen bei Inkubation mit Lovastatin die Spiegel aller drei untersuchten Prostaglandine im Vergleich zur Kontrolle signifikant an (siehe Abb. 3-6 und Abb. 3-7). Diese Lovastatin-vermittelte PG-Induktion wurde bei gleichzeitiger Inkubation mit NS-398 bei PGE_2 und PGD_2 aufgehoben. Die 15-d-PGJ_2 -Induktion wurde durch NS-398 teilweise aufgehoben. Die alleinige Gabe von NS-398 führte zu leicht verringerten Spiegeln von PGE_2 und PGD_2 , die zum Teil auch signifikant waren. Bei 15-d-PGJ_2 zeigten sich mit NS-398 hingegen leicht erhöhte Spiegel.

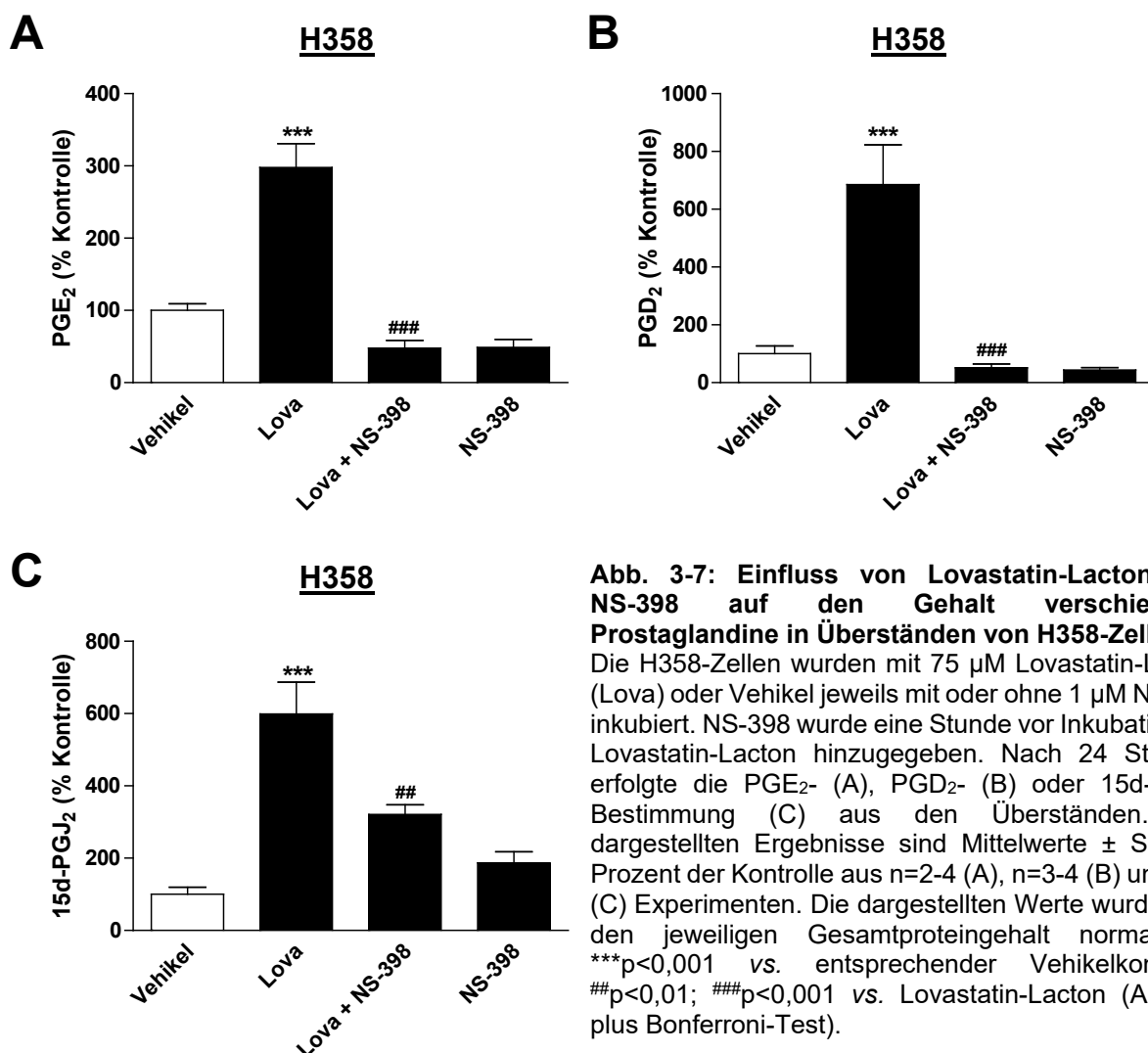


Abb. 3-7: Einfluss von Lovastatin-Lacton und NS-398 auf den Gehalt verschiedener Prostaglandine in Überständen von H358-Zellen

Die H358-Zellen wurden mit $75\ \mu\text{M}$ Lovastatin-Lacton (Lova) oder Vehikel jeweils mit oder ohne $1\ \mu\text{M}$ NS-398 inkubiert. NS-398 wurde eine Stunde vor Inkubation mit Lovastatin-Lacton hinzugegeben. Nach 24 Stunden erfolgte die PGE_2 - (A), PGD_2 - (B) oder 15-d-PGJ_2 -Bestimmung (C) aus den Überständen. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SEM in Prozent der Kontrolle aus $n=2-4$ (A), $n=3-4$ (B) und $n=4$ (C) Experimenten. Die dargestellten Werte wurden auf den jeweiligen Gesamtproteingehalt normalisiert. *** $p<0,001$ vs. entsprechender Vehikelkontrolle; ## $p<0,01$; ### $p<0,001$ vs. Lovastatin-Lacton (ANOVA plus Bonferroni-Test).

3.5 Wirkung von Lovastatin auf die PPAR γ -Aktivität sowie diesbezüglicher Einfluss eines COX-2- und eines PPAR γ -Inhibitors

Ein Marker für die PPAR γ -Aktivierung ist die PPAR γ -Translokation vom Zytosol in den Nukleus (Shibuya *et al.* 2002). Diese wurde sowohl fluoreszenzmikroskopisch an adhärentem Zellrasen als auch mittels Kernisolation und Proteinnachweis per Western Blot untersucht. Da angenommen wurde, dass eine PPAR γ -Aktivierung durch COX-2-abhängig synthetisierte Liganden, die Prostaglandine, vermittelt wird, wurde zudem der Einfluss des selektiven COX-2-Inhibitors NS-398 und des PPAR γ -Antagonisten GW9662 untersucht.

3.5.1 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen

Zellen der beiden zu untersuchenden Zelllinien wurden mit 50 μ M (A549) bzw. 75 μ M (H358) Lovastatin mit oder ohne 1 μ M NS-398 oder 10 μ M GW9662 inkubiert. NS-398 und GW9662 wurden eine Stunde vor Inkubation mit Lovastatin hinzugegeben. Nach zwölf (A549) bzw. 24 Stunden (H358) wurde die PPAR γ -Translokation vom Zytosol in den Zellkern unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

Sowohl bei A549- (siehe Abb. 3-8) als auch bei H358-Zellen (siehe Abb. 3-9) konnte nach Inkubation mit Lovastatin eine Akkumulation von PPAR γ im Nukleus festgestellt werden, welche durch NS-398 signifikant gehemmt wurde. Darüber hinaus konnte eine komplette Aufhebung der Akkumulation durch GW9662 erreicht werden. Alleinige Gaben von NS-398 und GW9662 hatten keinen Effekt auf die PPAR γ -Translokation.

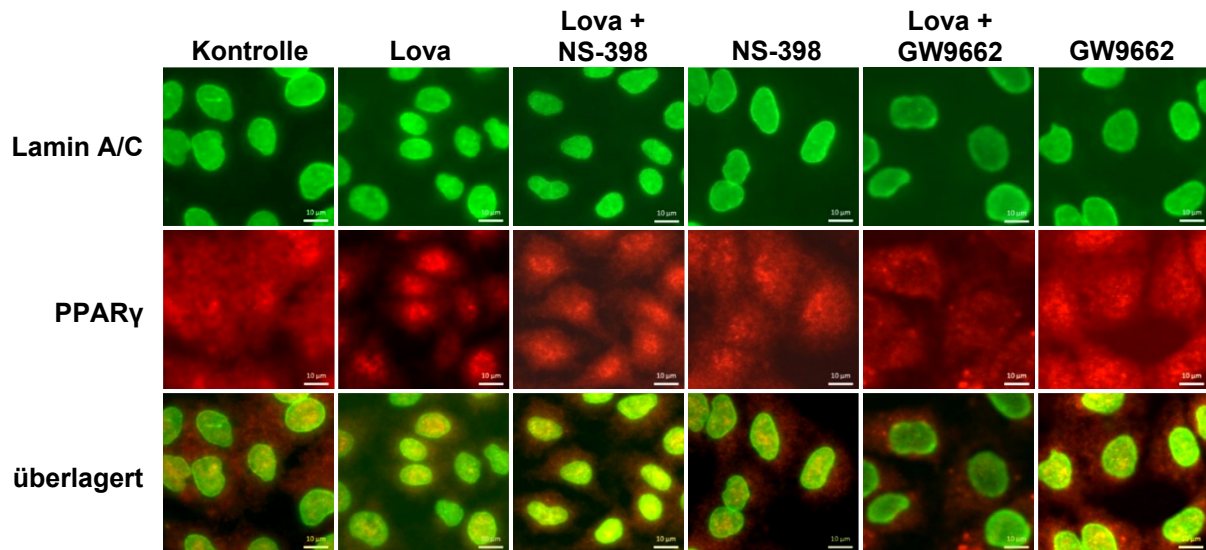
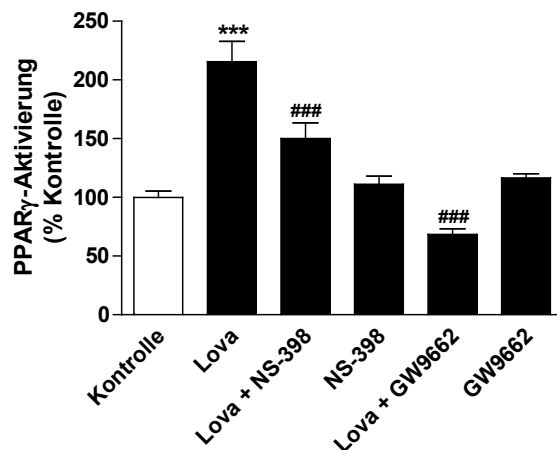
A**A549****B****A549**

Abb. 3-8: Einfluss von COX-2- und PPARγ-Inhibitoren auf die PPARγ-Translokation in A549-Zellen

A: Dargestellt sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von A549-Zellen. Die Zellen wurden mit 50 μ M Lovastatin-Lacton (Lova) oder Vehikel jeweils mit oder ohne 1 μ M NS-398 oder 10 μ M GW9662 inkubiert. NS-398 und GW9662 wurden eine Stunde vor Inkubation mit Lovastatin-Lacton hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von zwölf Stunden wurden die Zellen fixiert und mit einem Lamin A/C-Antikörper zur Darstellung der Zellkerne und einem PPARγ-Antikörper inkubiert. Sekundär-Antikörper waren ein goat anti-mouse Alexa Fluor 488 labelled IgG zum Nachweis von Lamin A/C (grün) und ein goat anti-rabbit Alexa Fluor 555 labelled IgG zum Nachweis von PPARγ (rot). Die Bilder zeigen repräsentative Ausschnitte. B: Zur Analyse der PPARγ-Translokation vom Zytosol in den Zellkern wurde die Intensität von PPARγ innerhalb Lamin A/C-positiver Areale quantifiziert. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SEM in Prozent der Kontrolle aus n=20 Zellkernen. ***p<0,001 vs. entsprechender Vehikelkontrolle; ###p<0,001 vs. Lovastatin-Lacton (ANOVA plus Bonferroni-Test).

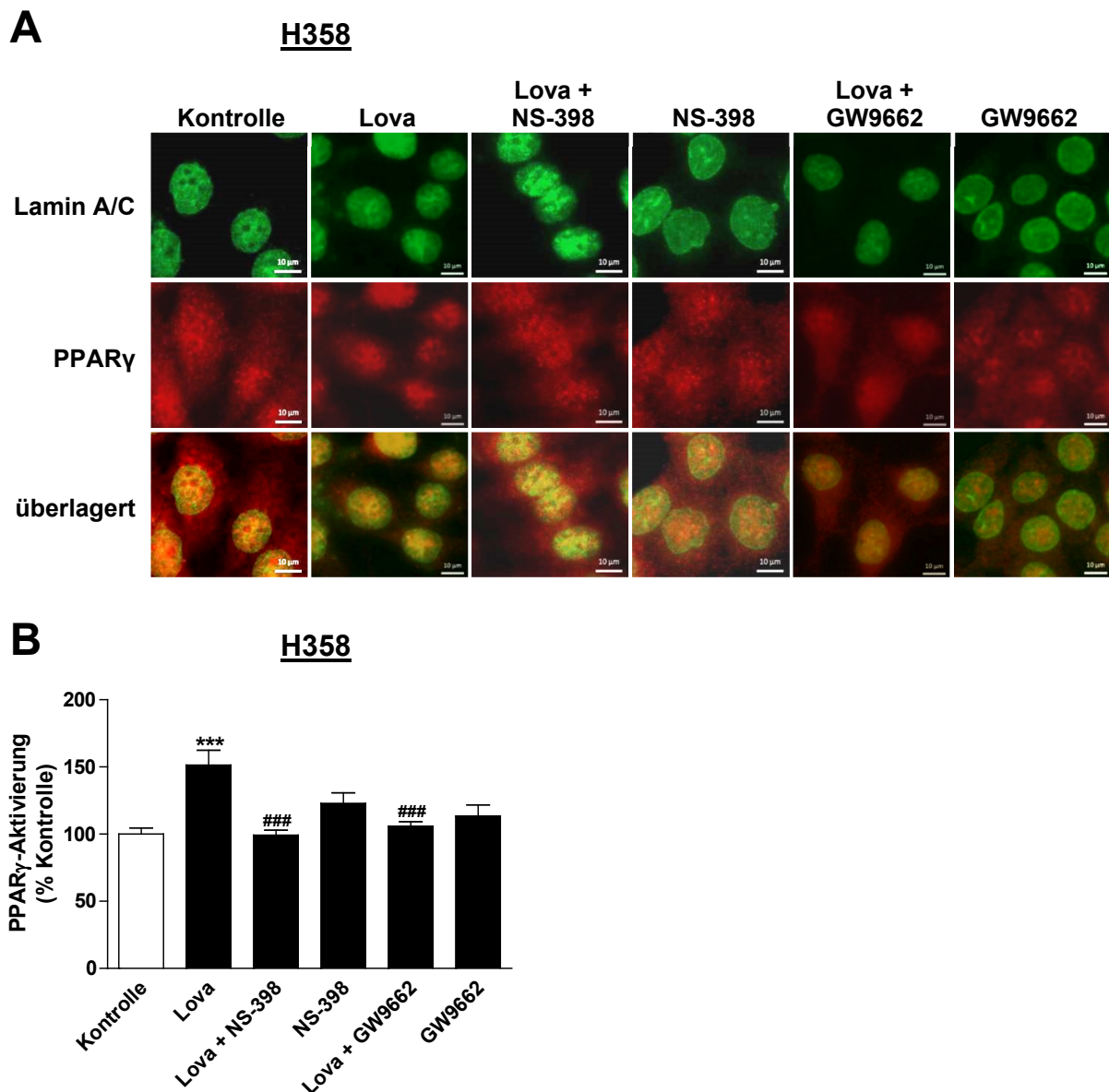


Abb. 3-9: Einfluss von COX-2- und PPAR γ -Inhibitoren auf die PPAR γ -Translokation in H358-Zellen

A: Dargestellt sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von H358-Zellen. Die Zellen wurden mit 75 μ M Lovastatin-Lacton (Lova) oder Vehikel jeweils mit oder ohne 1 μ M NS-398 oder 10 μ M GW9662 inkubiert. NS-398 und GW9662 wurden eine Stunde vor Inkubation mit Lovastatin-Lacton hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurden die Zellen fixiert und mit einem Lamin A/C-Antikörper zur Darstellung der Zellkerne und einem PPAR γ -Antikörper inkubiert. Sekundär-Antikörper waren ein goat anti-mouse Alexa Fluor 488 labelled IgG zum Nachweis von Lamin A/C (grün) und ein goat anti-rabbit Alexa Fluor 555 labelled IgG zum Nachweis von PPAR γ (rot). Die Bilder zeigen repräsentative Ausschnitte. B: Zur Analyse der PPAR γ -Translokation vom Zytosol in den Zellkern wurde die Intensität von PPAR γ innerhalb Lamin A/C-positiver Areale quantifiziert. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SEM in Prozent der Kontrolle aus n=20 Zellkernen. ***p<0,001 vs. entsprechender Vehikelkontrolle; ###p<0,001 vs. Lovastatin-Lacton (ANOVA plus Bonferroni-Test).

3.5.2 Untersuchungen mittels Kernisolation

Die Zellen wurden wie in 3.5.1 beschrieben für 18 Stunden (A549) bzw. 24 Stunden (H358) inkubiert. Nun wurden Western Blots aus Zellkernextrakten angefertigt und der PPAR γ -Gehalt im Zellkern analysiert.

Durch Lovastatin stieg in beiden Zelllinien der PPAR γ -Gehalt im Nukleus im Vergleich zur Kontrolle auf das etwa Doppelte (A549: 180 ± 25 %; H358: 228 ± 21 %). Dieser Effekt war unter Zugabe von NS-398 oder GW9662 rückläufig (siehe Abb. 3-10).

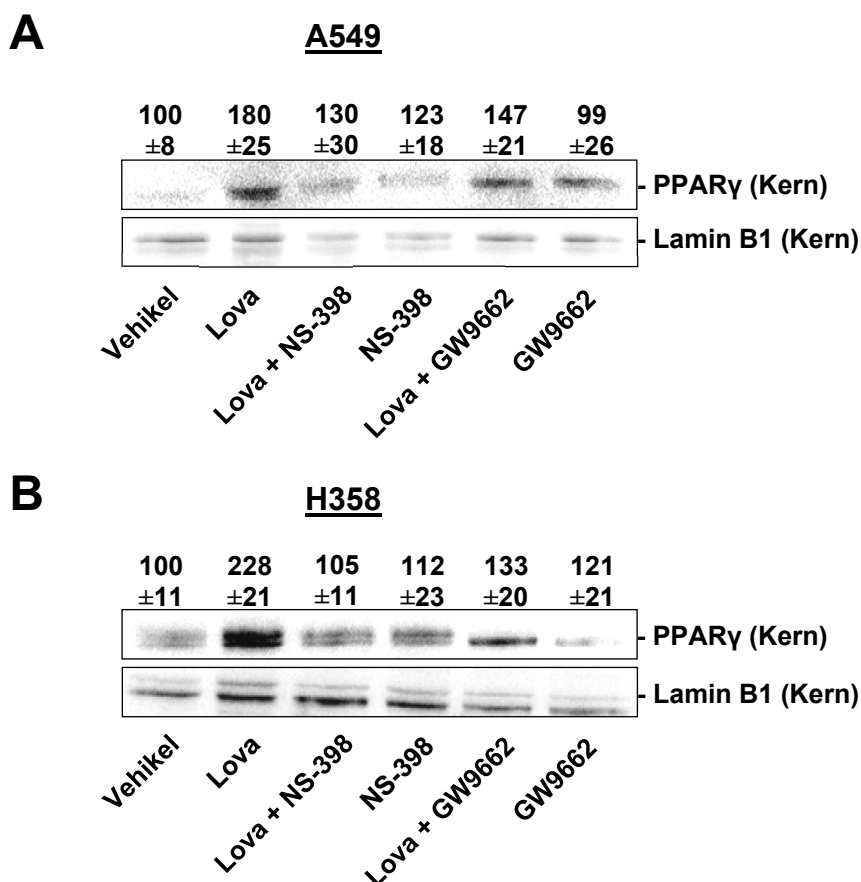


Abb. 3-10: Einfluss von COX-2- und PPAR γ -Inhibitoren auf die PPAR γ -Translokation in A549- und H358-Zellen

Es handelt sich um Western Blot-Analysen von Zellkernextrakten aus A549- (A) und H358-Zellen (B). Die Zellen wurden mit 50 μ M (A549) bzw. 75 μ M (H358) Lovastatin-Lacton (Lova) oder Vehikel jeweils mit oder ohne 1 μ M NS-398 oder 10 μ M GW9662 inkubiert. NS-398 und GW9662 wurden eine Stunde vor Inkubation mit Lovastatin-Lacton hinzugegeben. Die Inkubationszeit mit Lovastatin-Lacton betrug 18 Stunden (A549) bzw. 24 Stunden (H358). Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SEM in Prozent der Kontrolle aus n=4 (A) und n=5 (B) Experimenten. Die densitometrischen Werte wurden auf das nukleäre Protein Lamin B1 normalisiert. Gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Western Blot von vier (A) bzw. fünf (B) Blots.

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Lovastatin auf humane Lungenkarzinomzellen untersucht. Im Folgenden soll dabei die Rolle der COX-2, der Prostaglandine PGD₂, PGE₂ und 15d-PGJ₂ sowie des PPAR γ bei der beobachteten proapoptotischen Wirkung herausgestellt und diskutiert werden.

Zunächst konnte gezeigt werden, dass Lovastatin-Lacton, nicht jedoch Lovastatin-Säure bei beiden untersuchten Zelllinien die Zellviabilität senkt. Ebenso vermittelte hauptsächlich die Lactonform Kennzeichen der Apoptose. Bisher galt im Allgemeinen die Ansicht, dass Lovastatin-Säure die einzige aktive Form des Lovastatins sei. Die Arbeit von Rao *et al.* jedoch konnte zeigen, dass Lovastatin-Lacton bei humanen Mammakarzinomzellen über eine Hemmung des Proteasoms zum Zellzyklusarrest führt. Pravastatin hingegen, ein zur Lovastatin-Säure analoges „ringoffenes“ Statin, wies in der Studie keine proteasomale Hemmung auf (Rao *et al.* 1999). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen konnte eine Studie an differenzierten Neuroblastomzellen der Maus nachweisen, dass das Lacton Mevastatin über eine proteasomale Hemmung zu degenerativen Veränderungen sowie einer Viabilitätssenkung führt, wohingegen Pravastatin keine solchen Veränderungen hervorrief (Kumar *et al.* 2002). Umgekehrt vermittelte in einer Studie von Dimitroulakos *et al.* (2001) Lovastatin-Säure und nicht die Prodrug-Form Lovastatin-Lacton an verschiedenen pädiatrischen Tumoren sowie Plattenepithelkarzinomen proapoptotische Eigenschaften. In einer Studie von Klawitter *et al.* (2010) an humanen Mammakarzinomzellen wiesen beide Lovastatin-Formen proapoptotische Eigenschaften auf, wobei die Säure jedoch eine etwas stärkere Wirkung zeigte. Es scheinen somit die jeweiligen Wirkungen der Lacton- bzw. Säureform der Statine vom Zelltyp und sogar der Zelllinie abhängig zu sein. Dies könnte in den verschiedenen Aufnahmemechanismen der Statine begründet sein. Wie bereits im Abschnitt 1.1.1.3 erläutert, besitzen die „ringoffene“ bzw. „-geschlossene“ Form der Statine unterschiedliche physikochemische Eigenschaften. Während die lipophilen Statine Lovastatin-Lacton und Simvastatin-Lacton Membranen via passive Diffusion passieren, bedarf es beim hydrophilen Pravastatin zur Aufnahme in die Leber eines Membrantransporters (Nezasa *et al.* 2002).

Bezüglich des Lovastatins wurden in unserer Arbeitsgruppe die extra- und intrazellulären Konzentrationen von der Lacton- bzw. Säure-Form in A549- und H358-Zellen nach Inkubation mit jeweils 50 μM Lovastatin-Lacton oder -Säure über einen Zeitraum von 48 Stunden ermittelt. Nach Inkubation mit dem Lacton zeigten sich extrazellulär eine stetige Abnahme der Lacton-Konzentration und ein etwa entsprechender Anstieg der Säure-Konzentration, was auf den bereits erläuterten Interkonversionsmechanismus hinweist (siehe 1.1.1.3). Intrazellulär zeigten sich nach Inkubation mit dem Lacton initial hohe Konzentrationen des Lactons, welche zunächst das etwa 50- (A549) bzw. über 100-fache (H358) der korrespondierenden intrazellulären Säure-Konzentration betrug und dann stetig abfielen. Die intrazellulären Säure-Konzentrationen hingegen waren nach Inkubation mit dem Lacton oder der Säure nahezu identisch. Dies unterstützt die Vermutung, dass das lipophile Lovastatin-Lacton und nicht die Säure-Form für die proapoptischen Eigenschaften von Lovastatin verantwortlich ist (Walther *et al.* 2016).

Eine signifikante Viabilitätssenkung konnte in beiden Zelllinien ab einer Konzentration von 30 μM Lovastatin-Lacton beobachtet werden (siehe Abb. 3-1). Diese Konzentration übersteigt jene *in vivo* erreichte Plasmakonzentration an Lovastatin, die Holstein *et al.* 2006 in einer Studie an Probanden mit fortgeschrittenen malignen Erkrankungen ermittelten. Hierbei wurde Lovastatin intermittierend in Konzentrationen bis maximal 415 mg/m² Körperoberfläche oral verabreicht. Es wurden maximale Plasmaspiegel von 12,3 μM Lovastatin erreicht (Holstein *et al.* 2006). Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass es sich in dieser Studie um eine indirekte Messmethode handelte, bei welcher nur das bioaktive Lovastatin bzw. die aktiven Metabolite über den Grad der Hemmung der HMG-CoA-Reduktase gemessen wurden. Bei langfristiger, kontinuierlicher Statineinnahme mit unter Umständen höheren Dosierungen könnten trotz einer Halbwertszeit von ca. zwei bis vier Stunden (Mignini *et al.* 2008) sicher noch höhere Plasmakonzentrationen erreicht werden, was in weiteren klinischen Studien zu erforschen bleibt. Erwähnenswert ist, dass selbst bei hohen Dosen an Lovastatin weder eine limitierende Toxizität noch klinisch signifikante Anstiege der Kreatin-Phosphokinase oder der hepatischen Aminotransferase als Indikatoren für die typischen Nebenwirkungen von Statinen auftraten (Holstein *et al.* 2006).

Desweiteren konnte eine konzentrations- und zeitabhängige Induktion der COX-2 auf Proteinebene durch Lovastatin nachgewiesen werden. Die Ergebnisse gehen einher mit einer Studie von Chen *et al.* (2004), bei welcher in murinen Makrophagen eine COX-2-

Induktion durch Lovastatin festgestellt wurde, sowie einer Studie von Degraeve *et al.* (2001), bei welcher in humanen Gefäßmuskelzellen eine COX-2-Induktion durch Lovastatin und Mevastatin gezeigt werden konnte.

In der Studie von Rao *et al.* (1999) führte Lovastatin in humanen Mammakarzinomzellen über eine Hemmung des Proteasoms zum Zellarrest. Die Hemmung des Proteasoms gilt bei vielen Krebszellen als ein Mechanismus der Apoptoseinduktion. In der Arbeit von Chen *et al.* führte die Inkubation von humanen Lungentumorzellen mit den Proteasominhibitoren MG132, PSI-1 und Lactacystin zu einer Induktion der COX-2-Transkription (Chen *et al.* 2005). Somit könnte eine Lovastatin-vermittelte proteasomale Hemmung mit nachfolgender Induktion der COX-2-Transkription eine mögliche Erklärung für die in A549- und H358-Zellen beobachtete COX-2-Induktion sein.

Andererseits inhibierte Lovastatin in humanen intrahepatischen Cholangiokarzinomzellen die COX-2-Genexpression, führte aber dennoch zur Hemmung der Zellproliferation (Yang *et al.* 2016). Eine COX-2-Induktion bzw. -Inhibition scheint demnach zellabhängig zu sein.

Der Gehalt an PPAR γ -Protein im Vergleich zur Kontrolle veränderte sich im Gegensatz zur COX-2 in beiden untersuchten Zelllinien weder bei hohen Konzentrationen an Lovastatin noch bei einer langen Inkubationszeit. Dies geht mit der Vermutung einher, dass PPAR γ zwar durch COX-2-abhängig synthetisierte Prostaglandine aktiviert wird, dies sich jedoch als eine PPAR γ -Translokation vom Zytosol in den Nukleus äußert (Shibuya *et al.* 2002). Andererseits beeinflussten in der Arbeit von Ramer *et al.* (2013b) exogen zugegebenes PGD₂ und 15d-PGJ₂ in A549- und H358-Zellen nach längerer Inkubationszeit nicht nur den nukleären sondern auch den gesamten PPAR γ -Gehalt. Möglicherweise sind die verschiedenen Auswirkungen auf das Gesamt-PPAR γ in nicht übereinstimmenden Konzentrationen der Liganden begründet, bei welchen es sich zum einen um endogene, Lovastatin induzierte und zum anderen um exogen zugegebene Prostaglandine handelt.

Tatsächlich konnte eine PPAR γ -Translokation durch zwei unterschiedliche Verfahren, der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung von PPAR γ in adhärenenten Zellen und Western Blot-Analysen von Zellkernextrakten, nachgewiesen werden.

Die Lovastatin-abhängige PPAR γ -Translokation war sowohl durch den COX-2-Inhibitor NS-398 als auch durch den PPAR γ -Inhibitor GW9662, der die Bindung von Liganden an

PPAR γ blockiert, aufhebbar. Dies deutet darauf hin, dass für die PPAR γ -Translokation COX-2-abhängig synthetisierte Prostaglandine sowie eine Bindung von Liganden an PPAR γ erforderlich sind. Möglich wäre auch eine unspezifische, inhibierende Wirkung von NS-398 auf die PPAR γ -Translokation. Dies erscheint jedoch unter dem Aspekt, dass NS-398 eine durch 15d-PGJ₂ hervorgerufene PPAR γ -Kumulation im Zellkern in einer Studie unserer Arbeitsgruppe (Ramer *et al.* 2013b) nicht beeinflusste, unwahrscheinlich.

In verschiedenen Studien auch unserer Arbeitsgruppe konnte festgestellt werden, dass die Prostaglandine PGD₂ und 15d-PGJ₂ PPAR γ -aktivierende Liganden darstellen (Eichele *et al.* 2008; Ramer *et al.* 2013b). So führten exogen zugegebenes PGD₂ und 15d-PGJ₂ unter anderem in A549-Zellen *in vitro* zu einer erhöhten DNA-Fragmentierung, die unter GW9662 reversibel war (Ramer *et al.* 2013a; Ramer *et al.* 2013b). Desgleichen konnte eine PPAR γ -Translokation sowie eine Viabilitätssenkung in A549-Zellen durch Zugabe von PGD₂ und 15d-PGJ₂, nicht aber PGE₂, erreicht werden (Ramer *et al.* 2013a). Tsubouchi *et al.* (2000) beobachteten in A549-Zellen nach Zugabe von 15d-PGJ₂, aber nicht von PGE₂, eine PPAR γ -Translokation mit nachfolgender Apoptose. Auch *in vivo* konnte in Mäusen mit transplantierten A549-Tumoren die Behandlung mit 15d-PGJ₂ den Gehalt an PPAR γ erhöhen (Fulzele *et al.* 2007). Diese Befunde sprechen für eine Beteiligung von Prostaglandinen an der beobachteten PPAR γ -Aktivierung.

In der Tat resultierte die Inkubation mit Lovastatin in den beiden untersuchten Lungentumorzelllinien A549 und H358 in einem signifikanten Anstieg der Prostaglandine PGE₂, PGD₂ und 15d-PGJ₂. Diese Lovastatin-vermittelte PG-Induktion war bei gleichzeitiger Inkubation mit NS-398 bei PGE₂ und PGD₂ vollständig, bei 15d-PGJ₂ teilweise reversibel. Ein aktives COX-2-Enzym scheint demnach für die Synthese von PGE₂ und PGD₂ sowie zumindest teilweise von 15d-PGJ₂ vonnöten zu sein.

Eine mögliche Ursache dafür, dass die COX-2-Inhibition durch NS-398 zu keiner vollständigen Aufhebung des Lovastatin-vermittelten 15d-PGJ₂-Anstiegs führte, könnte in einer teilweise COX-2-unabhängigen 15d-PGJ₂-Synthese liegen. Tatsächlich entsteht 15d-PGJ₂ durch Wasserabspaltung aus PGD₂, welches jedoch für die Synthese seines Ausgangsstoffes PGH₂ eine intakte COX-2-Aktivität benötigt. Es wurde auch berichtet, dass 15d-PGJ₂ in humanen osteoarthrotischen Knorpelzellen die COX-2 induzieren kann und zwar ohne gleichzeitig die PGE₂-Spiegel zu erhöhen (Fahmi *et al.* 2002). Somit wäre ein Mechanismus vorstellbar, bei welchem ein positives Feedback von 15d-PGJ₂ auf die

COX-2 die COX-2-Hemmung durch NS-398 teilweise aufhebt. Dagegen spräche, dass in diesem Fall ein ähnlicher Effekt bei PGD₂ zu erwarten wäre, welcher jedoch nicht auftrat. Zudem konnten Patel *et al.* (2005) in A549-Zellen keinen Effekt von 15d-PGJ₂ auf die COX-2 beobachten. Der dem beobachteten Effekt zugrunde liegende Mechanismus bleibt folglich noch zu klären.

Eine alleinige Inkubation mit NS-398 führte bei beiden Zelllinien zu leicht verminderten Spiegeln von PGE₂ und PGD₂, was unter der Annahme, dass die Prostaglandine COX-2-abhängig synthetisiert werden, zu erwarten war. Auch in einer Studie unserer Arbeitsgruppe waren in A549- und H358-Zellen nach Inkubation mit NS-398 zumindest die PGE₂-Spiegel leicht vermindert (Ramer *et al.* 2013b).

Hinsichtlich 15d-PGJ₂ führte NS-398 in A549- und H358-Zellen zu leicht erhöhten Spiegeln, die jedoch nicht signifikant waren. Auch in den Arbeiten von Ramer *et al.* traten in diesen Zelllinien nur leicht aber nicht signifikant erhöhte 15d-PGJ₂-Spiegel nach Inkubation mit NS-398 auf (Ramer *et al.* 2013a; Ramer *et al.* 2013b). Ein Grund für die wider Erwarten fehlende NS-398-vermittelte Senkung der 15d-PGJ₂-Spiegel könnte auch hier auf dem mehrschrittigen Syntheseweg von 15d-PGJ₂ beruhen, denn der 15d-PGJ₂-Spiegel könnte trotz inhibierter COX-2 weiterhin von bereits synthetisiertem PGD₂ gespeist werden.

Bemerkenswert ist, dass NS-398 und GW9662 allein keinen Einfluss auf die PPAR γ -Translokation hatten. Es war anzunehmen, dass NS-398 über eine Verminderung der basalen PG-Synthese und GW9662 über eine vermehrte Blockierung der Ligandenbindungsstelle zu einer verminderten PPAR γ -Translokation führt. Dies konnte jedoch nicht beobachtet werden. Dass die basale PPAR γ -Kumulation im Vergleich zu der durch Lovastatin-induzierten PPAR γ -Kumulation im Zellkern zu gering für eine messbare Beeinflussung durch NS-398 oder GW9662 sein könnte, wäre eine mögliche Erklärung.

In Zusammenschau der Befunde scheint es wahrscheinlich, dass die unter Lovastatin-Gabe beobachtete PPAR γ -Aktivierung durch die COX-2-abhängig synthetisierten Prostaglandine PGD₂ und 15d-PGJ₂ erfolgt. Die PGE₂-Spiegel stiegen unter Inkubation mit Lovastatin zwar an, in einer Arbeit unserer Arbeitsgruppe führte exogen zugegebenes PGE₂ in A549-Zellen jedoch weder zu einer verminderten Viabilität, noch konnte PGE₂ eine signifikante PPAR γ -Translokation hervorrufen (Ramer *et al.* 2013a). Ebenso konnte

durch unsere Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass exogen zugeführtes PGE₂ im Gegensatz zu PGD₂ und 15d-PGJ₂ keine DNA-Fragmentierung in A549-Zellen hervorruft (Eichele *et al.* 2008). In humanen Neurogliomzellen (Hinz *et al.* 2004) ebenso wie in humanen Glioblastomzellen (Lalier *et al.* 2007) hingegen wirkt PGE₂ proapoptotisch. Die Wirkung von PGE₂ scheint demnach zellabhängig zu sein, was womöglich auch mit einer unterschiedlichen Expression von EP-Rezeptoren und damit einhergehend differierenden Reaktionsmechanismen zusammenhängt (Lalier *et al.* 2007).

Dass eine PPAR γ -Aktivierung als ein neuer möglicher antikanzerogener Mechanismus evaluiert wird, wird durch zahlreiche Studien unterstützt, in denen eine PPAR γ -Aktivierung zur Apoptose führte. In der Arbeit von Clay *et al.* (1999) vermittelten die PPAR γ -Liganden 15d-PGJ₂ und das synthetische Troglitazon über eine PPAR γ -Aktivierung eine Apoptose in humanen Mammakarzinomzellen. Verschiedene PGD₂-Metaboliten hemmten über eine PPAR γ -Bindung das Wachstum von Prostatakarzinomzellen (Kim *et al.* 2005). Wie Arbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigten, führt auch in humanen Zervixkarzinomzellen eine PPAR γ -Aktivierung zur Apoptose (Eichele *et al.* 2008; Eichele *et al.* 2009). Synthetische PPAR γ -Liganden aus der Gruppe der Thiazolidindione, ursprünglich als Antidiabetika konzipiert, vermitteln unterschiedliche antikanzerogene Eigenschaften via PPAR γ (Blanquicett *et al.* 2008). In der vorliegenden Arbeit konnte die PPAR γ -Aktivierung in humanen Lungenkarzinomzellen als ein proapoptotischer Mechanismus bestätigt werden.

Zusammengefasst zeigt die vorliegende Arbeit in Zusammenhang mit vorherigen Befunden der Arbeitsgruppe, dass die COX-2-Induktion mit nachfolgender PPAR γ -Aktivierung eine Schlüsselrolle bei der proapoptotischen Wirkung von Statinen auf humane Lungenkarzinomzellen spielt.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Statine sind häufig verwendete Lipidsenker, die seit einiger Zeit hinsichtlich einer antikanzerogenen Wirkung untersucht werden. Diese konnte bereits in experimentellen und epidemiologischen Studien nachgewiesen werden.

In dieser Arbeit wurden Lovastatin-Lacton und -Säure bezüglich einer proapoptotischen Wirkung bei humanen Lungenkarzinomzellen untersucht. Lovastatin-Säure bewirkte keine erhöhte Apoptoserate. Lovastatin-Lacton (Lovastatin) hingegen führte in den beiden getesteten Zelllinien A549 und H358 zu einer deutlichen Apoptose. Als Mechanismus konnte eine durch Lovastatin hervorgerufene Hochregulation des Enzyms Cyclooxygenase-2 (COX-2) festgestellt werden. Auch ein Anstieg der Prostaglandine (PG) PGD₂, PGE₂ und 15d-PGJ₂ konnte beobachtet werden, welcher bei gleichzeitiger Inkubation mit dem selektiven COX-2-Inhibitor NS-398 vermindert war. Dies impliziert, dass die Prostaglandine COX-2-abhängig *de novo* synthetisiert werden. Die Inkubation mit Lovastatin führte ebenfalls zu einer Aktivierung des Peroxisomen-Proliferator-aktivierten Rezeptors γ (PPAR γ), welche durch Ko-Inkubation von Lovastatin mit NS-398 oder dem PPAR γ -Antagonisten GW9662 aufgehoben werden konnte. Folglich sind sowohl ein funktionierendes COX-2-Enzym als auch eine Bindung der COX-2-abhängig synthetisierten Prostaglandine an PPAR γ für die Aktivierung notwendig. PPAR γ führt schließlich zur Apoptose. Die Abbildung 5-1 veranschaulicht die hier erläuterten Ergebnisse.

Zusammenfassend konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass die Lovastatin-vermittelte proapoptotische Wirkung auf humane Lungenkarzinomzellen via COX-2-Induktion und nachfolgender COX-2-abhängiger PPAR γ -Aktivierung vermittelt wird. Ob dieser Mechanismus auch in Nicht-Tumor-Zellen eine Rolle spielt, bleibt zu untersuchen. Zudem bedarf es weiterer präklinischer und klinischer Studien, um den Nutzen von Statinen in der Therapie von Lungenkrebs und anderen Tumorerkrankungen bewerten zu können. Möglicherweise ergänzen diese lipidsenkenden Pharmaka in Zukunft das Spektrum der gegen Krebs wirksamen Medikamente.

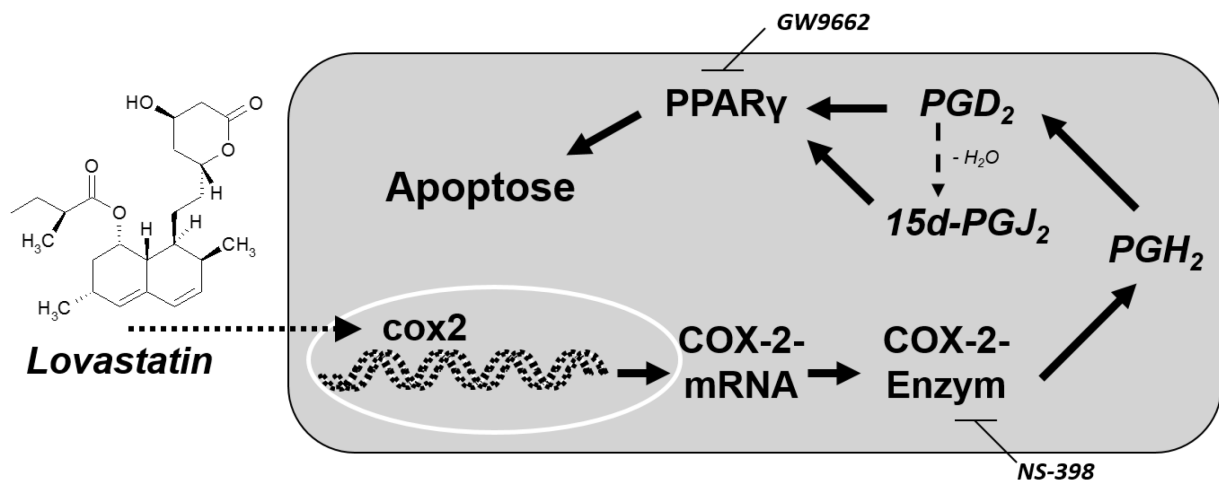


Abb. 5-1: Zusammenfassende Darstellung des möglichen Mechanismus, welcher der proapoptotischen Wirkung von Lovastatin bei Lungenkarzinomzellen zugrunde liegt.

Lovastatin wird unverändert in die Zelle aufgenommen und führt dort zu einem Anstieg der COX-2-mRNA und -Proteinexpression. Es folgt ein Anstieg der Prostaglandine PGD_2 und $15d-PGJ_2$, welche $PPAR\gamma$ (Peroxisomen-Proliferator-aktivierter Rezeptor γ) aktivieren. Dieser Transkriptionsfaktor leitet die Apoptose ein.

6 Literaturverzeichnis

Alberts AW (1988) Discovery, biochemistry and biology of lovastatin. *Am J Cardiol* 62:10J–15J.

Baigent C, Keech A, Kearney PM, Blackwell L, Buck G, Pollicino C, Kirby A, Sourjina T, Peto R, Collins R, Simes R (2005) Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet* 366:1267–1278.

Bernard MP, Bancos S, Sime PJ, Phipps RP (2008) Targeting cyclooxygenase-2 in hematological malignancies: rationale and promise. *Curr Pharm Des* 14:2051–2060.

Bhala N, Emberson J, Merhi A, Abramson S, Arber N, Baron JA, Bombardier C, Cannon C, Farkouh ME, FitzGerald GA, Goss P, Halls H, Hawk E, Hawkey C, Hennekens C, Hochberg M, Holland LE, Kearney PM, Laine L, Lanus A, Lance P, Laupacis A, Oates J, Patrono C, Schnitzer TJ, Solomon S, Tugwell P, Wilson K, Wittes J, Baigent C (2013) Vascular and upper gastrointestinal effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs: meta-analyses of individual participant data from randomised trials. *Lancet* 382:769–779.

Bielecki JW, Schraner C, Briner V, Kuhn M (1999) Rhabdomyolyse und cholestatische Hepatitis unter der Behandlung mit Simvastatin und Chlorzoxazon. *Schweiz Med Wochenschr* 129:514–518.

Billecke S, Draganov D, Counsell R, Stetson P, Watson C, Hsu C, La Du BN (2000) Human serum paraoxonase (PON1) isozymes Q and R hydrolyze lactones and cyclic carbonate esters. *Drug Metab Dispos* 28:1335–1342.

Blanquicett C, Roman J, Hart CM (2008) Thiazolidinediones as anti-cancer agents. *Cancer Ther* 6:25–34.

Bol DK, Rowley RB, Ho C-P, Pilz B, Dell J, Swerdel M, Kiguchi K, Muga S, Klein R, Fischer SM (2002) Cyclooxygenase-2 overexpression in the skin of transgenic mice results in suppression of tumor development. *Cancer Res* 62:2516–2521.

Bonovas S, Filioussi K, Sitaras NM (2008) Statins are not associated with a reduced risk of pancreatic cancer at the population level, when taken at low doses for managing hypercholesterolemia: evidence from a meta-analysis of 12 studies. *Am J Gastroenterol* 103:2646–2651.

Bonovas S, Filioussi K, Tsavaris N, Sitaras NM (2005) Use of statins and breast cancer: a meta-analysis of seven randomized clinical trials and nine observational studies. *J Clin Oncol* 23:8606–8612.

Brown MS, Goldstein JL (1980) Multivalent feedback regulation of HMG CoA reductase, a control mechanism coordinating isoprenoid synthesis and cell growth. *J Lipid Res* 21:505–517.

Cafforio P, Dammacco F, Gernone A, Silvestris F (2005) Statins activate the mitochondrial pathway of apoptosis in human lymphoblasts and myeloma cells. *Carcinogenesis* 26:883–891.

Carey FJ, Little MW, Pugh TFG, Ndokera R, Ing H, Clark A, Dennison A, Metcalfe MS, Robinson RJ, Hart AR (2013) The differential effects of statins on the risk of developing pancreatic cancer: a case-control study in two centres in the United Kingdom. *Dig Dis Sci* 58:3308–3312.

Chen J-C, Huang K-C, Wingerd B, Wu W-T, Lin W-W (2004) HMG-CoA reductase inhibitors induce COX-2 gene expression in murine macrophages: role of MAPK cascades and promoter elements for CREB and C/EBPbeta. *Exp Cell Res* 301:305–319.

Chen J-J, Huang W-C, Chen C-C (2005) Transcriptional regulation of cyclooxygenase-2 in response to proteasome inhibitors involves reactive oxygen species-mediated signaling pathway and recruitment of CCAAT/enhancer-binding protein delta and CREB-binding protein. *Mol Biol Cell* 16:5579–5591.

Clay CE, Namen AM, Atsumi G, Willingham MC, High KP, Kute TE, Trimboli AJ, Fonteh AN, Dawson PA, Chilton FH (1999) Influence of J series prostaglandins on apoptosis and tumorigenesis of breast cancer cells. *Carcinogenesis* 20:1905–1911.

Davignon J (2004) Beneficial cardiovascular pleiotropic effects of statins. *Circulation* 109 III:39-43.

Degraeve F, Bolla M, Blaie S, Créminon C, Quéré I, Boquet P, Lévy-Toledano S, Bertoglio J, Habib A (2001) Modulation of COX-2 expression by statins in human aortic smooth muscle cells. Involvement of geranylgeranylated proteins. *J Biol Chem* 276:46849–46855.

Deng Z, Zhang S, Yi L, Chen S (2013) Can statins reduce risk of lung cancer, especially among elderly people? A meta-analysis. *Chin J Cancer Res* 25:679–688.

Depasquale I, Wheatley DN (2006) Action of Lovastatin (Mevinolin) on an in vitro model of angiogenesis and its co-culture with malignant melanoma cell lines. *Cancer Cell Int* 6:9.

Desai P, Lehman A, Chlebowski RT, Kwan ML, Arun M, Manson JE, Lavasani S, Wasswertheil-Smoller S, Sarto GE, LeBoff M, Cauley J, Cote M, Beebe-Dimmer J, Jay A, Simon MS (2015) Statins and breast cancer stage and mortality in the Women's Health Initiative. *Cancer Causes Control* 26:529–539.

Díaz-González F, Sánchez-Madrid F (2015) NSAIDs: learning new tricks from old drugs. *Eur J Immunol* 45:679–686.

Dimitroulakos J, Ye LY, Benzaquen M, Moore MJ, Kamel-Reid S, Freedman MH, Yeger H, Penn LZ (2001) Differential sensitivity of various pediatric cancers and squamous cell carcinomas to lovastatin-induced apoptosis: therapeutic implications. *Clin Cancer Res* 7:158–167.

Draganov DI, Stetson PL, Watson CE, Billecke SS, La Du BN (2000) Rabbit serum paraoxonase 3 (PON3) is a high density lipoprotein-associated lactonase and protects low density lipoprotein against oxidation. *J Biol Chem* 275:33435–33442.

Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, Giardiello FM, Ferrenbach S, DuBois RN (1994) Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterol* 107:1183–1188.

Eichele K, Ramer R, Hinz B (2008) Decisive role of cyclooxygenase-2 and lipocalin-type prostaglandin D synthase in chemotherapeutics-induced apoptosis of human cervical carcinoma cells. *Oncogene* 27:3032–3044.

Eichele K, Ramer R, Hinz B (2009) R(+)-methanandamide-induced apoptosis of human cervical carcinoma cells involves a cyclooxygenase-2-dependent pathway. *Pharm Res* 26:346–355.

Elrod HA, Yue P, Khuri FR, Sun S-Y (2009) Celecoxib antagonizes perifosine's anticancer activity involving a cyclooxygenase-2-dependent mechanism. *Mol Cancer Ther* 8:2575–2585.

Euler US (1935) Über die spezifische blutdrucksenkende Substanz des menschlichen Prostata- und Samenblasensekretes. *Klin Wochenschr* 14:1182–1183.

Fahmi H, Pelletier J-P, Mineau F, Martel-Pelletier J (2002) 15d-PGJ(2) is acting as a 'dual agent' on the regulation of COX-2 expression in human osteoarthritic chondrocytes. *Osteoarthr Cartil* 10:845–848.

Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Alnemri ES (1994) CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 and mammalian Interleukin-1 β -converting enzyme. *J Biol Chem* 269:30761–30764.

Fulzele SV, Chatterjee A, Shaik MS, Jackson T, Ichite N, Singh M (2007) 15-Deoxy-Delta^{12,14}-prostaglandin J₂ enhances docetaxel anti-tumor activity against A549 and H460 non-small-cell lung cancer cell lines and xenograft tumors. *Anticancer Drugs* 18:65–78.

Futaki N, Takahashi S, Yokoyama M, Arai I, Higuchi S, Otomo S (1994) NS-398, a new anti-inflammatory agent, selectively inhibits prostaglandin G/H synthase/cyclooxygenase (COX-2) activity in vitro. *Prostaglandins* 47:55–59.

Glaeske G, Schicktanz C, Behrend M, Dicheva S (2015) BARMER GEK Arzneimittelreport 2015. Auswertungsergebnisse der BARMER GEK Arzneimitteldaten aus den Jahren 2013 bis 2014.

Goldstein JL, Brown MS (1987) Regulation of low-density lipoprotein receptors: implications for pathogenesis and therapy of hypercholesterolemia and atherosclerosis. *Circulation* 76:504–507.

Gröchenig HP (2001) Interaktionspotential der Statine. *J Kardiologie* 8:306–311.

Hamelin BA, Turgeon J (1998) Hydrophilicity/lipophilicity: relevance for the pharmacology and clinical effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Trends Pharmacol Sci* 19:26–37.

Han J-Y, Lee S-H, Yoo NJ, Hyung LS, Moon YJ, Yun T, Kim HT, Lee JS (2011a) A randomized phase II study of gefitinib plus simvastatin versus gefitinib alone in previously treated patients with advanced non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 17:1553–1560.

Han J-Y, Lim KY, Yu SY, Yun T, Kim HT, Lee JS (2011b) A phase 2 study of irinotecan, cisplatin, and simvastatin for untreated extensive-disease small cell lung cancer. *Cancer* 117:2178–2185.

Hawk MA, Cesen KT, Siglin JC, Stoner GD, Ruch RJ (1996) Inhibition of lung tumor cell growth in vitro and mouse lung tumor formation by lovastatin. *Cancer Lett* 109:217–222.

Hengartner MO (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407:770–776.

Henwood JM, Heel RC (1988) Lovastatin. A preliminary review of its pharmacodynamic properties and therapeutic use in hyperlipidaemia. *Drugs* 36:429–454.

Hida T, Yatabe Y, Achiwa H, Muramatsu H, Kozaki K, Nakamura S, Ogawa M, Mitsudomi T, Sugiura T, Takahashi T (1998) Increased expression of cyclooxygenase 2 occurs frequently in human lung cancers, specifically in adenocarcinomas. *Cancer Res* 58:3761–3764.

Hinz B, Brune K (2002) Cyclooxygenase-2--10 years later. *J Pharmacol Exp Ther* 300:367–375.

Hinz B, Ramer R, Eichele K, Weinzierl U, Brune K (2004) Up-regulation of cyclooxygenase-2 expression is involved in R(+)-methanandamide-induced apoptotic death of human neuroglioma cells. *Mol Pharmacol* 66:1643–1651.

Holstein SA, Knapp HR, Clamon GH, Murry DJ, Hohl RJ (2006) Pharmacodynamic effects of high dose lovastatin in subjects with advanced malignancies. *Cancer Chemother Pharmacol* 57:155–164.

Ishiyama M, Shiga M, Sasamoto K, Mizoguchi M, He P-g (1993) A new sulfonated tetrazolium salt that produces a highly water-soluble formazan dye. *Chem Pharm Bull* 41:1118–1122.

Jones KD, Couldwell WT, Hinton DR, Su Y, He S, Anker L, Law RE (1994) Lovastatin induces growth inhibition and apoptosis in human malignant glioma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 205:1681–1687.

Kantola T, Kivistö KT, Neuvonen PJ (1998a) Effect of itraconazole on the pharmacokinetics of atorvastatin. *Clin Pharmacol Ther* 64:58–65.

Kantola T, Kivistö KT, Neuvonen PJ (1998b) Erythromycin and verapamil considerably increase serum simvastatin and simvastatin acid concentrations. *Clin Pharmacol Ther* 64:177–182.

Kantola T, Kivistö KT, Neuvonen PJ (1998c) Grapefruit juice greatly increases serum concentrations of lovastatin and lovastatin acid. *Clin Pharmacol Ther* 63:397–402.

Kavalipati N, Shah J, Ramakrishnan A, Vasawala H (2015) Pleiotropic effects of statins. *Indian J Endocrinol Metab* 19:554–562.

Kearney AS, Crawford LF, Mehta SC, Radebaugh GW (1993) The interconversion kinetics, equilibrium, and solubilities of the lactone and hydroxyacid forms of the HMG-CoA reductase inhibitor, CI-981. *Pharm Res* 10:1461–1465.

Khurana V, Bejjanki HR, Caldito G, Owens MW (2007) Statins reduce the risk of lung cancer in humans: a large case-control study of US veterans. *Chest* 131:1282–1288.

Kieć-Wilk B, Dembińska-Kieć A, Olszanecka A, Bodzioch M, Kawecka-Jaszcz K (2005) The selected pathophysiological aspects of PPARs activation. *J Physiol Pharmacol* 56:149–162.

Kim J, Yang P, Suraokar M, Sabichi AL, Llansa ND, Mendoza G, Subbarayan V, Logothetis CJ, Newman RA, Lippman SM, Menter DG (2005) Suppression of prostate tumor cell growth by stromal cell prostaglandin D synthase-derived products. *Cancer Res* 65:6189–6198.

Klawitter J, Shokati T, Moll V, Christians U, Klawitter J (2010) Effects of lovastatin on breast cancer cells: a proteo-metabonomic study. *Breast Cancer Res* 12:R16.

Köhler H-R, Dhein J, Alberti G, Krammer PH (1990) Ultrastructural analysis of apoptosis induced by the monoclonal antibody anti-APO-1 on a lymphoblastoid B cell line. *Ultrastruct Pathol* 14:513–518.

Kubatka P, Kajo K, Zihlavnikova K, Adamicova K, Vybohova D, Pec M, Nosal V, Stollarova N, Bojkova B, Kassayova M, Orendas P (2012) Immunohistochemical and histomorphological analysis of rat mammary tumors after simvastatin treatment. *Neoplasma* 59:516–523.

Kubatka P, Kruzliak P, Rotrekl V, Jelinkova S, Mladosevicova B (2014) Statins in oncological research: from experimental studies to clinical practice. *Crit Rev Oncol Hematol* 92:296–311.

Kuc C, Jenkins A, van Dross RT (2012) Arachidonoyl ethanolamide (AEA)-induced apoptosis is mediated by J-series prostaglandins and is enhanced by fatty acid amide hydrolase (FAAH) blockade. *Mol Carcinog* 51:139–149.

Kumar B, Andreatta C, Koustas WT, Cole WC, Edwards-Prasad J, Prasad KN (2002) Mevastatin induces degeneration and decreases viability of cAMP-induced differentiated neuroblastoma cells in culture by inhibiting proteasome activity, and mevalonic acid lactone prevents these effects. *J Neurosci Res* 68:627–635.

Kusama T, Mukai M, Iwasaki T, Tatsuta M, Matsumoto Y, Akedo H, Inoue M, Nakamura H (2002) 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors

reduce human pancreatic cancer cell invasion and metastasis. *Gastroenterol* 122:308–317.

Kusama T, Mukai M, Iwasaki T, Tatsuta M, Matsumoto Y, Akedo H, Nakamura H (2001) Inhibition of epidermal growth factor-induced RhoA translocation and invasion of human pancreatic cancer cells by 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors. *Cancer Res* 61:4885–4891.

Lalier L, Cartron P-F, Pedelaborde F, Olivier C, Loussouarn D, Martin SA, Meflah K, Menanteau J, Vallette FM (2007) Increase in PGE2 biosynthesis induces a Bax dependent apoptosis correlated to patients' survival in glioblastoma multiforme. *Oncogene* 26:4999–5009.

Lee SJ, Lee I, Lee J, Park C, Kang WK (2014) Statins, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors, potentiate the anti-angiogenic effects of bevacizumab by suppressing angiopoietin2, BiP, and Hsp90 α in human colorectal cancer. *Br J Cancer* 111:497–505.

Leesnitzer LM, Parks DJ, Bledsoe RK, Cobb JE, Collins JL, Consler TG, Davis RG, Hull-Ryde EA, Lenhard JM, Patel L, Plunket KD, Shenk JL, Stimmel JB, Therapontos C, Willson TM, Blanchard SG (2002) Functional consequences of cysteine modification in the ligand binding sites of peroxisome proliferator activated receptors by GW9662. *Biochemistry* 41:6640–6650.

Liao JK, Laufs U (2005) Pleiotropic effects of statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45:89–118.

Liu Y, Tang W, Wang J, Xie L, Li T, He Y, Deng Y, Peng Q, Li S, Qin X (2014) Association between statin use and colorectal cancer risk: a meta-analysis of 42 studies. *Cancer Causes Control* 25:237–249.

Lytras T, Nikolopoulos G, Bonovas S (2014) Statins and the risk of colorectal cancer: an updated systematic review and meta-analysis of 40 studies. *World J Gastroenterol* 20:1858–1870.

Marcelli M, Cunningham GR, Haidacher SJ, Padayatty SJ, Sturgis L, Kagan C, Denner L (1998) Caspase-7 is activated during lovastatin-induced apoptosis of the prostate cancer cell line LNCaP. *Cancer Res* 58:76–83.

Mendes RT, Stanczyk CP, Sordi R, Otuki MF, dos Santos FA, Fernandes D (2012) Selective inhibition of cyclooxygenase-2: risks and benefits. *Rev Bras Reumatol* 52:767–782.

Mignini F, Tomassoni D, Streccioni V, Traini E, Amenta F (2008) Pharmacokinetics and bioequivalence study of two tablet formulations of lovastatin in healthy volunteers. *Clin Exp Hypertens* 30:95–108.

Mueller E, Smith M, Sarraf P, Kroll T, Aiyer A, Kaufman DS, Oh W, Demetri G, Figg WD, Zhou XP, Eng C, Spiegelman BM, Kantoff PW (2000) Effects of ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:10990–10995.

Na H-K, Surh Y-J (2003) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) ligands as bifunctional regulators of cell proliferation. *Biochem Pharmacol* 66:1381–1391.

Nezasa K-i, Higaki K, Matsumura T, Inazawa K, Hasegawa H, Nakano M, Koike M (2002) Liver-specific distribution of rosuvastatin in rats: comparison with pravastatin and simvastatin. *Drug Metab Dispos* 30:1158–1163.

Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, Gareau Y, Griffin PR, Labelle M, Lazebnik YA, Munday NA, Raju SM, Smulson ME, Yamin T-T, Yu VL, Miller DK (1995) Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 376:37–43.

Nielsen SF, Nordestgaard BG, Bojesen SE (2012) Statin use and reduced cancer-related mortality. *N Engl J Med* 367:1792–1802.

Osmak M (2012) Statins and cancer: current and future prospects. *Cancer Lett* 324:1–12.

Patel KM, Wright KL, Whittaker P, Chakravarty P, Watson ML, Ward SG (2005) Differential modulation of COX-2 expression in A549 airway epithelial cells by structurally distinct PPAR(γ) agonists: evidence for disparate functional effects which are independent of NF-(κ)B and PPAR(γ). *Cell Signal* 17:1098–1110.

Pradelli D, Soranna D, Scotti L, Zambon A, Catapano A, Mancina G, La Vecchia C, Corrao G (2013) Statins and primary liver cancer: a meta-analysis of observational studies. *Eur J Cancer Prev* 22:229–234.

Pronai L, Hritz I, Molnar B, Herszenyi L, Tulassay Z (2003) COX-2-selective inhibitors (COXIBs): gastrointestinal safety. *Int J Immunopathol Pharmacol* 16:23–30.

Prueksaritanont T, Ma B, Fang X, Subramanian R, Yu J, Lin JH (2001) beta-Oxidation of simvastatin in mouse liver preparations. *Drug Metab Dispos* 29:1251–1255.

Prueksaritanont T, Subramanian R, Fang X, Ma B, Qiu YU, Lin JH, Pearson PG, Baillie TA (2002) Glucuronidation of statins in animals and humans: A novel mechanism of statin lactonization. *Drug Metab Dispos* 30:505–512.

Ramer R, Heinemann K, Merkord J, Rohde H, Salamon A, Linnebacher M, Hinz B (2013a) COX-2 and PPAR- γ confer cannabidiol-induced apoptosis of human lung cancer cells. *Mol Cancer Ther* 12:69–82.

Ramer R, Walther U, Borchert P, Laufer S, Linnebacher M, Hinz B (2013b) Induction but not inhibition of COX-2 confers human lung cancer cell apoptosis by celecoxib. *J Lipid Res* 54:3116–3129.

Rao S, Porter DC, Chen X, Herliczek T, Lowe M, Keyomarsi K (1999) Lovastatin-mediated G1 arrest is through inhibition of the proteasome, independent of hydroxymethyl glutaryl-CoA reductase. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:7797–7802.

Rizzo MT (2011) Cyclooxygenase-2 in oncogenesis. *Clin Chim Acta* 412:671–687.

Rubins JB, Greatens T, Kratzke RA, Tan AT, Polunovsky VA, Bitterman P (1998) Lovastatin induces apoptosis in malignant mesothelioma cells. *Am J Respir Crit Care Med* 157:1616–1622.

Rumzhum NN, Ammit AJ (2016) Cyclooxygenase 2: its regulation, role and impact in airway inflammation. *Clin Exp Allergy* 46:397–410.

Scher JU, Pillinger MH (2005) 15d-PGJ2: the anti-inflammatory prostaglandin? *Clin Immunol* 114:100–109.

Schirris TJJ, Ritschel T, Bilos A, Smeitink JAM, Russel FGM (2015) Statin Lactonization by Uridine 5'-Diphospho-glucuronosyltransferases (UGTs). *Mol Pharm* 12:4048–4055.

Schwab JM, Beiter T, Linder JU, Laufer S, Schulz JE, Meyermann R, Schluesener HJ (2003) COX-3--a virtual pain target in humans? *FASEB J* 17:2174–2175.

Serajuddin AT, Ranadive SA, Mahoney EM (1991) Relative lipophilicities, solubilities, and structure-pharmacological considerations of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors pravastatin, lovastatin, mevastatin, and simvastatin. *J Pharm Sci* 80:830–834.

Shannon J, Tewoderos S, Garzotto M, Beer TM, Derenick R, Palma A, Farris PE (2005) Statins and prostate cancer risk: a case-control study. *Am J Epidemiol* 162:318–325.

Shellman YG, Ribble D, Miller L, Gendall J, Vanbuskirk K, Kelly D, Norris DA, Dellavalle RP (2005) Lovastatin-induced apoptosis in human melanoma cell lines. *Melanoma Res* 15:83–89.

Shibuya A, Wada K, Nakajima A, Saeki M, Katayama K, Mayumi T, Kadowaki T, Niwa H, Kamisaki Y (2002) Nitration of PPARgamma inhibits ligand-dependent translocation into the nucleus in a macrophage-like cell line, RAW 264. *FEBS Lett* 525:43–47.

Simon MS, Desai P, Wallace R, Wu C, Howard BV, Martin LW, Schlecht N, Liu S, Jay A, LeBlanc ES, Rohan T, Manson J (2016) Prospective analysis of association between statins and pancreatic cancer risk in the Women's Health Initiative. *Cancer Causes Control* 27:415–423.

Singh S, Singh AG, Singh PP, Murad MH, Iyer PG (2013) Statins are associated with reduced risk of esophageal cancer, particularly in patients with Barrett's esophagus: a systematic review and meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 11:620–629.

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Frovenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150:76–85.

Soliman E, Henderson KL, Danell AS, van Dross R (2016) Arachidonoyl-ethanolamide activates endoplasmic reticulum stress-apoptosis in tumorigenic keratinocytes: Role of cyclooxygenase-2 and novel J-series prostamides. *Mol Carcinog* 55:117–130.

Sumi S, Beauchamp RD, Townsend CM, Uchida T, Murakami M, Rajaraman S, Ishizuka J, Thompson JC (1992) Inhibition of pancreatic adenocarcinoma cell growth by lovastatin. *Gastroenterol* 103:982–989.

Tan M, Song X, Zhang G, Peng A, Li X, Li M, Liu Y, Wang C (2013) Statins and the risk of lung cancer: a meta-analysis. *PLoS One* 8:e57349.

Todd PA, Goa KL (1990) Simvastatin. A review of its pharmacological properties and therapeutic potential in hypercholesterolaemia. *Drugs* 40:583–607.

Tsubouchi Y, Sano H, Kawahito Y, Mukai S, Yamada R, Kohno M, Inoue K, Hla T, Kondo M (2000) Inhibition of human lung cancer cell growth by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists through induction of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 270:400–405.

Tucker ON, Dannenberg AJ, Yang EK, Zhang F, Teng L, Daly JM, Soslow RA, Masferrer JL, Woerner BM, Koki AT, Fahey TJ (1999) Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in human pancreatic cancer. *Cancer Res* 59:987–990.

Vainio P, Lehtinen L, Mirtti T, Hilvo M, Seppänen-Laakso T, Virtanen J, Sankila A, Nordling S, Lundin J, Rannikko A, Orešič M, Kallioniemi O, Iljin K (2011) Phospholipase PLA2G7, associated with aggressive prostate cancer, promotes prostate cancer cell migration and invasion and is inhibited by statins. *Oncotarget* 2:1176–1190.

Vosper J, Masuccio A, Kullmann M, Ploner C, Geley S, Hengst L (2015) Statin-induced depletion of geranylgeranyl pyrophosphate inhibits cell proliferation by a novel pathway of Skp2 degradation. *Oncotarget* 6:2889–2902.

Walther U, Emmrich K, Ramer R, Mittag N, Hinz B (2016) Lovastatin lactone elicits human lung cancer cell apoptosis via a COX-2/PPAR γ -dependent pathway. *Oncotarget* 7:10345–10362.

Wang A, Aragaki AK, Tang JY, Kurian AW, Manson JE, Chlebowski RT, Simon M, Desai P, Wassertheil-Smoller S, Liu S, Kritchevsky S, Wakelee HA, Stefanick ML (2016) Statin use and all-cancer survival: prospective results from the Women's Health Initiative. *Br J Cancer* 115:129–135.

Wang D, DuBois RN (2016) The role of prostaglandin E2 in tumor-associated immunosuppression. *Trends Mol Med* 22:1–3.

Wójcik C, Bury M, Stokłosa T, Giermasz A, Feleszko W, Młynarczuk I, Pleban E, Basak G, Omura S, Jakóbisiak M (2000) Lovastatin and simvastatin are modulators of the proteasome. *Int J Biochem Cell Biol* 32:957–965.

Xiao H, Yang CS (2008) Combination regimen with statins and NSAIDs: a promising strategy for cancer chemoprevention. *Int J Cancer* 123:983–990.

Xu Z, Choudhary S, Voznesensky O, Mehrotra M, Woodard M, Hansen M, Herschman H, Pilbeam C (2006) Overexpression of COX-2 in human osteosarcoma cells decreases proliferation and increases apoptosis. *Cancer Res* 66:6657–6664.

Yang S-H, Lin H-Y, Changou CA, Chen C-H, Liu Y-R, Wang J, Jiang X, Luh F, Yen Y (2016) Integrin $\beta 3$ and LKB1 are independently involved in the inhibition of proliferation by lovastatin in human intrahepatic cholangiocarcinoma. *Oncotarget* 7:362–373.

Yano M, Matsumura T, Senokuchi T, Ishii N, Murata Y, Taketa K, Motoshima H, Taguchi T, Sonoda K, Kukidome D, Takuwa Y, Kawada T, Brownlee M, Nishikawa T, Araki E (2007) Statins activate peroxisome proliferator-activated receptor gamma through extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase-dependent cyclooxygenase-2 expression in macrophages. *Circ Res* 100:1442–1451.

Yu O, Eberg M, Benayoun S, Aprikian A, Batist G, Suissa S, Azoulay L (2014) Use of statins and the risk of death in patients with prostate cancer. *J Clin Oncol* 32:5–11.

Yu X, Pan Y, Ma H, Li W (2013) Simvastatin inhibits proliferation and induces apoptosis in human lung cancer cells. *Oncol Res* 20:351–357.

Zhao TT, Trinh D, Addison CL, Dimitroulakos J (2010) Lovastatin inhibits VEGFR and AKT activation: synergistic cytotoxicity in combination with VEGFR inhibitors. *PLoS One* 5:e12563.

Zidar N, Odar K, Glavac D, Jerse M, Zupanc T, Stajer D (2009) Cyclooxygenase in normal human tissues--is COX-1 really a constitutive isoform, and COX-2 an inducible isoform? *J Cell Mol Med* 13:3753–3763.

Zimmermann KC, Sarbia M, Weber AA, Borchard F, Gabbert HE, Schrör K (1999) Cyclooxygenase-2 expression in human esophageal carcinoma. *Cancer Res* 59:198–204.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1: Cholesterinsynthese-Weg und Wirkung von Statinen	1
Abb. 1-2: Chemische Struktur von Lovastatin-Lacton (links), Lovastatin-Säure (mittig) und HMG-CoA (rechts)	3
Abb. 1-3: Bifunktionelle Rolle der Cyclooxygenase (COX) bei der Biosynthese von Prostaglandinen, Prostacyclin und Thromboxanen	10
Abb. 1-4: Biosynthese der Prostanoiden	13
Abb. 2-1: Schematische Darstellung der Bindung von Primär- und Sekundärantikörper.....	32
Abb. 2-2: Beispiel von Schwarz-Weiß-Foto mit Proteinmarker (links) und Chemilumineszenz-Bild (rechts) bei COX-2-Nachweis.....	33
Abb. 3-1: Einfluss von Lovastatin-Lacton und -Säure auf die Viabilität in A549- und H358-Zellen..	37
Abb. 3-2: Einfluss von Lovastatin-Lacton und -Säure auf Apoptoseparameter in A549- und H358-Zellen.....	38
Abb. 3-3: Konzentrationsabhängige Wirkung von Lovastatin-Lacton auf die COX-2-Expression in A549- und H358-Zellen	40
Abb. 3-4: Konzentrationsabhängige Wirkung von Lovastatin-Lacton auf die PPAR γ -Expression in A549- und H358-Zellen	41
Abb. 3-5: Zeitabhängige Wirkung von Lovastatin-Lacton auf die PPAR γ - und COX-2-Expression in A549- und H358-Zellen	42
Abb. 3-6: Einfluss von Lovastatin-Lacton und NS-398 auf den Gehalt verschiedener Prostaglandine in Überständen von A549-Zellen	43
Abb. 3-7: Einfluss von Lovastatin-Lacton und NS-398 auf den Gehalt verschiedener Prostaglandine in Überständen von H358-Zellen	44
Abb. 3-8: Einfluss von COX-2- und PPAR γ -Inhibitoren auf die PPAR γ -Translokation in A549-Zellen.....	46
Abb. 3-9: Einfluss von COX-2- und PPAR γ -Inhibitoren auf die PPAR γ -Translokation in H358-Zellen.....	47

Abb. 3-10: Einfluss von COX-2- und PPARγ-Inhibitoren auf die PPARγ-Translokation in A549- und H358-Zellen	48
Abb. 5-1: Zusammenfassende Darstellung des möglichen Mechanismus, welcher der proapoptotischen Wirkung von Lovastatin auf Lungenkarzinomzellen zugrunde liegt ...	56

Tabellenverzeichnis

Tab. 1-1: Vorkommen und Funktion der PPAR-Isoformen.....	15
Tab. 2-1: Verwendete Primärantikörper und ihre Verdünnung.....	22
Tab. 2-2: Verwendete Sekundärantikörper und ihre Verdünnung.....	22
Tab. 2-3: Kulturgefäß, Volumen und Zellzahl je nach Versuch (Aussaat)	26
Tab. 2-4: Volumen je nach Versuch (Stimulation).....	27
Tab. 2-5: Pipettierschema zur Erstellung einer Eichgeraden zur Proteinbestimmung (ausreichend für zwei Platten).....	29
Tab. 2-6: Ansätze für je zwei 10%ige Gele	30

Danksagung

Zunächst bedanke ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Burkhard Hinz für die unkomplizierte Bereitstellung dieses interessanten Themas und die kontinuierliche wissenschaftliche Betreuung und Unterstützung.

Weiterhin danke ich Herrn PD Dr. Udo Walther und Herrn Dr. Robert Ramer für die praktische Mitbetreuung der Arbeit und die ständige Diskussionsbereitschaft offener Fragen.

Vielen Dank an die Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des Instituts für Toxikologie und Pharmakologie der Universitätsmedizin Rostock für die gute Arbeitsatmosphäre und den fachlichen sowie logistischen Beistand. Insbesondere danke ich Philipp Borchert, der mich geduldig und kompetent in die Tiefen der Laborarbeit eingeführt hat und für jedes technische Problem einen Ausweg wusste.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie für die bisherige Unterstützung in jedweder Hinsicht sowie die ständige Motivation.

Zu guter Letzt danke ich Jojo und Jana für ihr geduldiges Zuhören und die aufmunternden Kaffees und Schokokekse.

Thesen

1. Statine sind häufig verwendete Lipidsenker, für die zurzeit auch antikanzerogene Eigenschaften diskutiert werden.
2. Die im Folgenden beschriebenen Ergebnisse sind an den Zelllinien A549 und H358 erhoben worden, bei welchen es sich um adhärente, humane, nicht-kleinzellige Lungenkarzinomzellen handelt. Die Zellen wurden jeweils mit Lovastatin-Lacton als inaktive Prodrug-Form oder mit Lovastatin-Säure als aktive Form einer HMG-CoA-Reduktase-hemmenden Substanz für zwei bis 48 Stunden inkubiert.
3. Lovastatin-Lacton (im Folgenden als Lovastatin bezeichnet) zeigt im Gegensatz zu Lovastatin-Säure bei humanen Lungenkarzinomzellen eine proapoptotische Wirkung.
4. Die Inkubation mit Lovastatin hat eine Hochregulation des Enzyms Cyclooxygenase-2 (COX-2) zur Folge.
5. Die Inkubation mit Lovastatin führt zu einem Anstieg der Prostaglandine PGD₂, PGE₂ und 15d-PGJ₂. Eine Ko-Inkubation mit dem selektiven COX-2-Inhibitor NS-398 vermindert den jeweiligen Prostaglandin-Anstieg.
6. Die Inkubation mit Lovastatin resultiert in einer Aktivierung des Peroxisomen-Proliferator-aktivierten Rezeptors γ (PPAR γ), welche durch Ko-Inkubation mit NS-398 oder dem PPAR γ -Antagonisten GW9662 aufgehoben werden kann.
7. Die Aktivierung von PPAR γ führt zur Apoptose.
8. Zusammenfassend ist die COX-2-abhängige Prostaglandin-Synthese und die Prostaglandin-abhängige PPAR γ -Aktivierung durch Lovastatin ein zur Apoptose führender Mechanismus.
9. Es bedarf weiterer präklinischer und klinischer Studien, um den Nutzen von Statinen in der Therapie von Lungenkarzinomen und anderen malignen Tumorerkrankungen bewerten zu können. Möglicherweise ergänzen Statine in Zukunft das Spektrum der gegen maligne Tumoren wirksamen Medikamente.